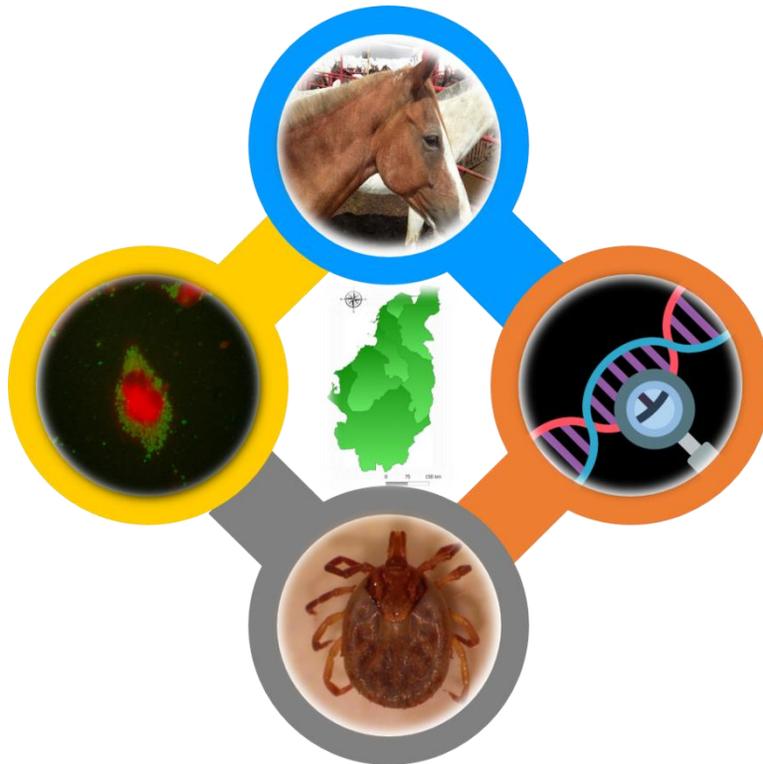




IDENTIFICACIÓN DE POTENCIALES ÁREAS DE RIESGO DE RICKETTSIOSIS EN EL NOROESTE DE COLOMBIA A TRAVÉS DEL USO DE ÉQUIDOS COMO CENTINELAS



**Estudiante:
LEIDY YOANA ACEVEDO GUTIÉRREZ**

**Medellín, Colombia
2019**

**IDENTIFICACIÓN DE POTENCIALES ÁREAS DE RIESGO DE RICKETTSIOSIS EN EL
NOROESTE DE COLOMBIA A TRAVÉS DEL USO DE ÉQUIDOS COMO CENTINELAS**

**Trabajo de investigación presentado a la Corporación Ciencias Básicas Biomédicas
de la Universidad de Antioquia, como requisito para obtener el grado de Doctora en
Ciencias Básicas Biomédicas, énfasis de Microbiología y Parasitología.**

TUTOR

Juan David Rodas González, MV., MSc., PhD.

COMITÉ TUTORIAL

Marcelo Bahia Labruna, MV., PhD.

Luis Enrique Paternina, Biol., DSc.

Jorge Arturo Fernández, MV., PhD.

Medellín, Colombia

Corporación Ciencias Básicas Biomédicas

2019

Agradecimientos

Este trabajo no se hubiera realizado sin la ayuda y apoyo de muchas personas que de alguna manera participaron del proceso, por esta razón doy infinitas gracias a las personas que cito a continuación:

A mi familia y a su apoyo incondicional

A los compañeros y amigos de la línea de zoonosis emergentes y re-emergentes, del grupo Centauro a los que ya volaron y a los que aún quedan.

A mi tutor, el Dr. Rodas por su guía y apoyo.

A los integrantes del comité tutorial (Drs. Marcelo Labruna, Luis Paternina y Jorge Fernández), por su compromiso, dedicación y sus aportes importantes.

Al grupo de investigación de Dr. Marcelo Labruna Sao Paulo por su apoyo durante la pasantía.

A René Ramírez por su apoyo en la construcción del proyecto y recolección de las muestras.

A Juan Quintero por sus aportes y correcciones.

Al ente financiador CODI UdeA por financiamiento proyecto 2014-321

Al personal de Planta de Beneficio La Rinconada por su disposición

A los estudiantes de MVZ del UCES, que apoyaron en la toma de las muestras con absoluto compromiso.

A los grupos de malaria e Inmunovirología por el préstamo de equipos y espacios.

Al Dr. Gustavo Valbuena, quien sugirió la idea original de este proyecto.

Contenido

Agradecimientos	2
Contenido	3
Lista de tablas	7
Lista de figuras	8
Resumen	9
Abstract	10
Introducción general	11
Objetivos	15
General	15
Específicos	15
Capítulo 1.	17
Los équidos como centinelas de bacterias transmitidas por garrapatas	17
Resumen	17
Introducción	17
Principales garrapatas que parasitan équidos en América	19
Principales bacterias transmitidas por garrapatas a los équidos	22
Conclusiones	28
Referencias	29
Capítulo 2.	42
Evidencia serológica en équidos de exposición a <i>Rickettsia</i> spp. y potenciales zonas de circulación de la bacteria en el noroeste de Colombia	42
Resumen	42
Palabras claves	42
Introducción	42

Metodología	44
Tipo y sitio de estudio	44
Cálculo de la muestra	44
Criterios de inclusión	44
Criterios de exclusión	44
Recolección de las muestras	45
Pruebas serológicas	45
Análisis estadístico	46
Análisis por sistemas de información geográfica	46
Consideraciones éticas	47
Resultados	47
Generales	47
Serológicos	48
Análisis espacial de los resultados serológicos	52
Discusión	53
Referencias	56
Capítulo 3.	61
Detección molecular de <i>Rickettsia</i> spp. en garrapatas de équidos y aislamiento de “<i>Candidatus Rickettsia franklinii</i>”, una nueva especie del grupo ancestral en el noroeste de Colombia	61
Resumen	61
Introducción	61
Metodología	63
Recolección de garrapatas	63
Detección molecular y aislamiento	63
Análisis filogenético	65
Análisis estadístico	65
Resultados	65
Discusión	70
Capítulo 4.	80

Presencia de dos especies del complejo <i>Amblyomma cajennense</i> (Acari: Ixodidae), potenciales vectores de <i>Rickettsia rickettsii</i> y posibles zonas de simpatria en el noroeste de Colombia	80
Resumen	80
Palabras claves	80
Introducción	81
Metodología	82
Recolección de las garrapatas	82
Taxonomía tradicional	82
Análisis molecular	82
Análisis genético	83
Resultados	83
Discusión	86
Referencias	87
Capítulo 5.	92
Propuesta de potenciales áreas de circulación de <i>Rickettsia</i> spp. en el noroeste de Colombia a partir del uso de équidos como centinelas	92
Resumen	92
Introducción	92
Metodología	94
Área de estudio	94
Propuesta de mapa de riesgo	95
Resultados	97
Discusión	98
Bibliografía	100
Capítulo 6. Anexo	104
Evidencia serológica de la exposición en équidos del noroeste de Colombia a <i>Ehrlichia</i> spp. y <i>Coxiella burnetii</i>	104

Resumen	104
Introducción	105
Materiales y métodos	106
Resultados	107
Discusión	111
Referencias	114
Limitaciones y Perspectivas	120
Conclusión general	122
Material suplementario	1203

Lista de tablas

Tabla 1-1. Información general de las bacterias transmitidas por garrapatas reportados en équinos del continente americano.	20
Tabla 1-2. Estudios serológicos contra el GFM de <i>Rickettsia</i> en équidos de Centro y Suramérica	24
Tabla 2-1. Distribución de la seropositividad por municipio probable de origen, antígeno y APIRH	48
Tabla 2-2. Descripción por departamento de las variables incluidas en el análisis multivariado y razón de prevalencia.	49
Tabla 2-3. Factores y marcadores de riesgo asociados con la seropositividad para <i>Rickettsia</i> en équidos.	50
Tabla 3-1. Lista de genes, cebadores, tamaño amplificado y temperatura de alineamiento.	61
Tabla 3-2. Datos de las muestras positivas con secuencias de la PCR convencional.	65
Tabla 5-1. Determinantes, criterios e indicadores usados para la construcción de AMCD	92
Tabla 5-2. Reporte de casos de rickettsiosis en el área de estudio	94
Tabla 6-1. Cebadores para identificar <i>Ehrlichia</i> spp. y <i>C. burnetii</i>	103
Tabla 6-2. Descripción de los hallazgos por seropositividad para <i>Ehrlichia</i> spp. y <i>C. burnetii</i> según las variables estudiadas.	106
Tabla 6-3. Factores y marcadores de riesgo asociados con la seropositividad para <i>Ehrlichia</i> spp y <i>C. burnetii</i> en équidos.	107

Lista de figuras

Figura 1-1. Países donde se han dado reportes de bacterias transmitidas por garrapatas en équidos del continente americano.	21
Figura 2-1. Frecuencia de infestación por garrapatas según especie.	46
Figura 2-2. Gráfico de cajas y bigotes que describe la dispersión de los títulos de anticuerpos por cada especie de <i>Rickettsia</i> analizada.	47
Figura 2-3. Conglomerados espaciales según cada especie de <i>Rickettsia</i> .	51
Figura 3-1. Municipios de origen y proporciones de las garrapatas recolectadas.	63
Figura 3-2. Mapa donde se muestra los municipios, hospederos y garrapatas con muestras positivas	64
Figura 3-3. Dendrogramas de los genes estudiados	66
Figura 4-1. Mapa de distribución especies del complejo <i>A. cajennense</i> en la región de estudio	81
Figura 4-2. Apariencia de la apertura genital de dos hembras identificadas morfológicamente como <i>A. mixtum</i> y <i>A. patinoi</i>	81
Figura 4-3. A) Árbol filogenético Máxima Verosimilitud del gen 12S con soporte aBayes y red haplotípica	82
Figura 5-1. Mapas de idoneidad y de riesgo potencial para rickettsiosis.	93
Figura 6-1. Mapa de la distribución espacial de las muestras seropositivas y de los conglomerados para <i>Ehrlichia</i> spp y <i>Coxiella burnetii</i> en équidos	104
Figura 6-2. Dispersión de los títulos de anticuerpos por cada especie de <i>Rickettsia</i> analizada.	105
Tabla S-1. Números de acceso al Genbank de las secuencias utilizadas para el análisis filogenético.	115
Tabla S-2. Números de acceso al Genbank de las secuencias obtenidas en el estudio	116
Figura final.	119

Resumen

Introducción: las rickettsiosis transmitidas por garrapatas son enfermedades zoonóticas desatendidas. En los últimos años en Colombia se ha obtenido evidencia de la circulación de rickettsias en algunas zonas bien definidas, pero se sospecha que la distribución es más amplia.

Objetivo: Identificar áreas potenciales de circulación de especies de *Rickettsia* transmitidas por garrapatas utilizando los équidos como centinelas en el noroeste de Colombia.

Métodos: en este estudio se incluyeron équidos llevados a la Planta de Beneficio “La Rinconada” en Rionegro, Antioquia. A los animales se les recolectó sangre, garrapatas y datos epidemiológicos. Se realizó inmunofluorescencia para especies de *Rickettsia*, pruebas moleculares para detectar la infección por rickettsias en las garrapatas y para diferenciar las especies del complejo *A. cajennense*. La información anterior se integró en un Análisis Multicriterio de Decisión en un Sistema de Información Geográfica para explorar potenciales áreas de riesgo.

Resultados: se muestrearon 649 équidos provenientes 28 municipios de los departamentos del noroeste del país, infestados con *Amblyomma cajennense* s.l., *Amblyomma ovale*, *Rhipicephalus microplus* y *Dermacentor nitens*, se encontró una seropositividad del 53% (IC_{95%} 49.5-57.2), y un porcentaje mínimo de infección en garrapatas del 2.6%. Se identificaron cuatro especies de *Rickettsia* (*R. felis*, “*Candidatus R. colombianensi*”, “*Candidatus R. franklinii*” y una cercana al “*Candidatus R. mendelii*”). Se sugieren áreas potenciales para especies de *Rickettsia*, en las cuales sobresalen el noroeste de los departamentos de Antioquia, Córdoba y Sucre.

Conclusión: Los hallazgos de este estudio en el noroeste de Colombia y gracias al uso de los équidos como centinelas, indican zonas probables de circulación de *Rickettsia* spp., de diversas especies de garrapatas, incluyendo dos especies del complejo *A. cajennense*, (*A. mixtum* y *A. patinoi*). Además, se detectaron diversas especies de *Rickettsia* de los grupos ancestral, transicional y de las fiebres manchadas en las garrapatas. Esta información en conjunto permitió construir una propuesta de riesgo para rickettsiosis, la cual esperamos sea de ayuda para estudios posteriores, especialmente de vigilancia, prevención y tratamiento adecuado de los cuadros clínicos compatibles en la región.

Abstract

Introduction: tick-borne rickettsiosis are neglected zoonotic diseases. During the recent years in Colombia, we and other have collected evidence about the circulation of rickettsias in some well-defined areas, but it is suspected that bacterial distribution might be wider.

Aim: to identify potential areas of circulation of tick-borne *Rickettsia* species using equids as sentinels in northwestern Colombia.

Methods: we performed a project with equids taken from “La Rinconada” slaughterhouse in Rionegro, Antioquia. From these animals we collected blood, ticks, and epidemiological data. Indirect Immunofluorescence assay was carried out for *Rickettsia* species, and molecular tests to detect rickettsia infection in ticks and distinguish *A. cajennense* complex species. The above information was integrated into a Multicriteria Decision Analysis in a Geographic Information System to explore potential risk areas.

Results: We sampled 649 equids from 28 municipalities in the northwest departments of the country, that were infested with *Amblyomma cajennense* s.l., *Amblyomma ovale*, *Rhipicephalus microplus* and *Dermacentor nitens*. We found a 53% (CI_{95%} 49.5-57.2) seropositivity, and a minimum percentage of infection in ticks of 2.6%. Four species of *Rickettsia* were identified (*R. felis*, “*Candidatus R. colombianensis*”, “*Candidatus R. franklinii*” and one close to “*Candidatus R. mendelii*”). We suggest potential areas for *Rickettsia* spp., surveillance in the northwest of Antioquia, Córdoba and Sucre.

Conclusion: Our findings in northwestern Colombia and the use of equids as sentinels, indicate probable areas of circulation of *Rickettsia* spp., infecting various tick species, including two from the *A. cajennense* complex, (*A. mixtum* and *A. patinoi*). We also detected various species of *Rickettsia* of the ancestral, transitional, and spotted fever groups in ticks from these regions. All this information taken together, allowed us to build some proposed risk areas for rickettsiosis, which we hope will promote further studies, and suggest a program for surveillance, prevention and adequate treatment of rickettsia-like clinical conditions in the region.

Introducción general

En los últimos años, los agentes transmitidos por garrapatas han recibido mayor atención en el campo de la salud humana y veterinaria debido a que han presentado unos cambios en sus dinámicas [1]. Estos cambios involucran, por ejemplo, un aumento en sus incidencias entre 8 a 10 veces mayores para Estados Unidos, la aparición de nuevos y múltiples patógenos como el Virus del Síndrome Trombocitopenia y Fiebre Severa, *Borrelia miyamotoi*, *Ehrlichia minasensis*, entre otros [2–4]. Los cambios en estas dinámicas son resultado de diferentes procesos que afectan la ecología de los vectores, como, por ejemplo, cambios en el uso de la tierra, pérdida de la biodiversidad, deforestación, cambios en la dinámica/ecología de los reservorios animales, cambios en el comportamiento humano, crecimiento de la población y cambio climático [1,5].

La identificación de los cambios en las dinámicas se ha logrado en parte por el adecuado proceso de vigilancia epidemiológica que se realiza en algunos países. Estos países cuentan con protocolos bien definidos y aplicados, donde se cumple la finalidad básica de la vigilancia epidemiológica que es determinar la magnitud, y la distribución temporal y espacial de las enfermedades [6]

La búsqueda de la información sobre enfermedades infecciosas puede hacerse a través de dos formas básicas, a través de una vigilancia activa o pasiva. Existen otras modalidades especializadas como es el caso del uso de centinelas, que se basa en la información proporcionada por un grupo seleccionado de fuentes, las cuales revisten importancia porque permiten el trabajo con enfermedades emergentes o reemergentes que son poco conocidas o enfermedades de las que se desconoce sus patrones de comportamiento [7,8].

La rickettsiosis es una enfermedad reemergente desatendida que, al igual que otras que son transmitidas por garrapatas, ha presentado un incremento de su incidencia en los últimos años. En el continente americano se han reportado diferentes especies y cepas de *Rickettsia* transmitidas por garrapatas causando enfermedad en humanos, como es el caso de *Rickettsia rickettsii*, *Rickettsia parkeri*, *Rickettsia parkeri* cepa Atlantic rainforest y *Rickettsia felis*, asimismo se ha reportado la circulación de otras especies con capacidad patogénica desconocida como *R. amblyommatis*, *R. rhipicephali*, entre otras [9,10].

En Colombia se han reportado brotes y casos por *Rickettsia* de baja y alta virulencia. Entre las de baja virulencia recientemente se ha detectado en el Urabá antioqueño, la

infección de un campesino con *Rickettsia parkeri* cepa Atlantic rainforest, el cual presentó una rickettsiosis no severa con formación de escara (datos aún no publicados del grupo Centauro) [11]. Por otra parte, la especie de alta virulencia que circula en Colombia es *R. rickettsii*, la cual se ha presentado con casos aislados y brotes según estudios llevados a cabo en el país; algunos de estos últimos, en la primera década de este siglo XXI, con porcentajes de letalidad entre 24-54% [12,13]. Se considera que en el país el subreporte para esta entidad es común, debido en parte al desconocimiento de esta por el personal de salud, al difícil diagnóstico, y a su presentación clínica que se solapa con otras enfermedades más prevalentes como dengue, leptospirosis, malaria, entre otras.

Tradicionalmente se conocen unas áreas endémicas, como Villeta, Cundinamarca, y El Urabá antioqueño y el departamento de Córdoba, donde a través de estudios se ha podido ahondar en la eco-epidemiología de esta dolencia [13]. La evidencia más reciente apunta a que podrían existir zonas previamente no estudiadas donde se pueden estar dando procesos de infección por *Rickettsia*. En el año 2014 y 2015 se atendieron en el grupo de investigación Centauro, dos pacientes que por pruebas serológicas y de aislamiento fueron diagnosticados con rickettsiosis causada por *R. rickettsii* en nuevas zonas de Antioquia (municipio de Uramita). Lo llamativo de estos casos, era que provenían de una región en la que no se sospechaba de la circulación de la bacteria [14]. Esta evidencia aunada a estudios serológicos para Antioquia que muestran casos de seroconversión en las subregiones del Urabá y el Bajo cauca antioqueño, soportan nuestra sospecha de que la circulación de las especies de *Rickettsia* es más amplia de lo que se preveía.

Las rickettsiosis en Colombia no son de notificación obligatoria, por lo que se hace necesario la utilización de algunas estrategias diferentes para su vigilancia. En países donde los ciclos han sido mejor caracterizados, se han establecidos animales claves que sirven como centinelas [15,16]. Entre los centinelas más conocidos y que se acercan a la eco-epidemiología de Colombia, se cuentan con los caninos y équidos, dado principalmente porque son hospederos principales de algunas garrapatas que pueden actuar como vectores de especies de *Rickettsia*, y, asimismo, pueden servir como indicadores de la circulación de las bacterias [17]. En Colombia se sospecha que los vectores de los casos más severos de rickettsiosis, son las garrapatas del complejo *Amblyomma cajennense*, las cuales infestan frecuentemente a los équidos, por esta razón

se considera que estos mamíferos serían unos adecuados centinelas para identificar áreas de rickettsiosis.

Ante lo anterior se propuso la siguiente pregunta de investigación: ¿Cuáles son las áreas potenciales de circulación de especies de *Rickettsia* transmitidas por garrapatas utilizando los équidos como centinelas en el noroeste de Colombia? Esta pregunta de investigación se abordó a través de los objetivos que se exponen en la siguiente sesión.

Referencias

- [1] De la Fuente J, Estrada-Peña A. Ticks and tick-borne pathogens on the rise. *Ticks Tick Borne Dis* 2012;3:115–6. doi:10.1016/j.ttbdis.2012.03.001.
- [2] Wormser GP, Pritt B. Update and Commentary on Four Emerging Tick-Borne Infections: Ehrlichia muris-like Agent, Borrelia miyamotoi, Deer Tick Virus, Heartland Virus, and Whether Ticks Play a Role in Transmission of Bartonella henselae. *Infect Dis Clin North Am* 2015;29:371–81. doi:10.1016/j.idc.2015.02.009.
- [3] Cabezas-Cruz A, Zwegarth E, Vancová M, Broniszewska M, Grubhoffer L, Passos LMF, et al. Ehrlichia minasensis sp. nov., isolated from the tick Rhipicephalus microplus. *Int J Syst Evol Microbiol* 2016;66:1426–30.
- [4] Márquez-Jiménez FJ, Hidalgo-Pontiveros A, Contreras-Chova F, Jesús Rodríguez-Liévana J, Ángel Muniain-Ezurra M. Las garrapatas (Acarina: Ixodida) como transmisores y reservorios de microorganismos patógenos en España. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2005;23:94–102. doi:10.1157/13071613.
- [5] Jones K., Patel N., Levy M., Storeygard A, Balk D, Gittleman J., et al. Global trends in emerging infectious diseases. *Nature* 2008;451:990–3. doi:10.1038/nature06536.
- [6] Reif JS. Animal sentinels for environmental and public health. *Public Health Rep* 2011;126 Suppl:50–7.
- [7] Rabinowitz P, Scotch M, Conti L. Human and animal sentinels for shared health risks. *Vet Ital* 2009;45:23.
- [8] Halliday JEB, Meredith AL, Knobel DL, Shaw DJ, Bronsvoort BMDC, Cleaveland S. A framework for evaluating animals as sentinels for infectious disease surveillance. *J R Soc Interface* 2007;4:973–84. doi:10.1098/rsif.2007.0237.
- [9] Parola P, Paddock CD, Socolovschi C, Labruna MB, Mediannikov O, Kernif T, et al. Update on tick-borne rickettsioses around the world: A geographic approach. *Clin*

Microbiol Rev 2013;26:657–702. doi:10.1128/CMR.00032-13.

- [10] Labruna MB. Ecology of Rickettsia in South America 2009;166:156–66. doi:10.1111/j.1749-6632.2009.04516.x.
- [11] Hidalgo M, Orejuela L, Fuya P, Carrillo P, Hernandez J, Parra E, et al. Rocky mountain spotted fever, Colombia. Emerg Infect Dis 2007;13:1058–60. doi:10.3201/eid1307.060537.
- [12] Acosta J, Urquijo L, Díaz A, Sepúlveda M, Mantilla G, Heredia D, et al. Brote de Rickettsia Rickettsii en Necoclí, Antioquia, febrero-marzo, 2006. Inf Quinc Epidemiológico Nac 2006;11:177–92.
- [13] Hidalgo M, Lizarazo D, Ovalle M, Castañeda E, Heredia D, Zambrano P, et al. Brote de rickettsiosis en Los Córdoba, departamento de Córdoba, febrero-marzo 2007. Inf Quinc Epidemiol Nac 2007;12:118-20. Spanish.
- [14] Londoño AF, Arango-Ferreira C, Acevedo-Gutiérrez LY, Paternina LE, Montes C, Ruiz I, et al. A Cluster of Cases of Rocky Mountain Spotted Fever in an Area Of Colombia Not Known to be Endemic for This Disease. Am J Trop Med Hyg 2019;101:336–42. doi:10.4269/ajtmh.18-1007.
- [15] Horta MC, Labruna MB, Sangioni LA, Vianna MC, Gennari SM, Galvao MA, et al. Prevalence of antibodies to spotted fever group rickettsiae in humans and domestic animals in a Brazilian spotted fever-endemic area in the state of Sao Paulo, Brazil: serologic evidence for infection by Rickettsia rickettsii and another spotted fever gro. Am J Trop Med Hyg 2004;71:93–7.
- [16] Szabo MPJ, Pinter A, Labruna MB. Ecology, biology and distribution of spotted-fever tick vectors in Brazil. Front Cell Infect Microbiol 2013;3:1–9. doi:10.3389/fcimb.2013.00027.
- [17] Londoño AF, Acevedo-Gutiérrez LY, Marín D, Contreras V, Díaz FJ, Valbuena G, et al. Wild and domestic animals likely involved in rickettsial endemic zones of Northwestern Colombia. Ticks Tick Borne Dis 2017;8:887–94. doi:10.1016/j.ttbdis.2017.07.007.

Objetivos

General

Identificar áreas potenciales de circulación de especies de *Rickettsia* transmitidas por garrapatas utilizando los équidos como centinelas en el noroeste de Colombia.

Específicos

1. Determinar la proporción de seropositividad a *Rickettsia* en équidos del noroeste de Colombia, sus factores demográficos, ecológicos y potenciales áreas de riesgo.
2. Determinar la proporción de infección por *Rickettsia* spp. en las especies de garrapatas recolectadas en los équidos.
3. Identificar las especies del complejo *A. cajennense* que circulan en équidos de la región.
4. Establecer potenciales zonas de riesgo de rickettsiosis en el noroeste de Colombia.

Los objetivos se desarrollan en diversos capítulos, los cuales se presentan en formato artículo. A continuación, se resume la información general que se presentará en cada uno de los capítulos:

Capítulo 1

En este capítulo se presenta la fundamentación del uso de los équidos como centinelas en la transmisión de bacterias transmitidas por garrapatas, haciendo énfasis en *Rickettsia*. Asimismo, sirve como marco de referencia para utilizar los équidos específicamente para la vigilancia.

Capítulo 2

Este capítulo nos ofrece los resultados de un estudio analítico transversal para los datos serológicos de los équidos con el cual se da el desarrollo del objetivo número uno.

Capítulo 3

El capítulo 3 presenta los resultados de los hallazgos moleculares realizados en las garrapatas que se encontraron infestando los équidos, lo cual da respuesta al objetivo dos.

Capítulo 4

En este se hace una descripción de las especies del complejo *Amblyomma cajennense* que se encontraron infestando a los équidos y que da respuesta al objetivo tres.

Capítulo 5

Se presenta una propuesta integrativa para identificar potenciales zonas de riesgo a través de la consideración de los datos moleculares, serológicos, acarológicos y ecológicos para un abordaje de tipo análisis multicriterio integrado de un sistema de información geográfica, lo cual permitió desarrollar el objetivo cuatro.

Capítulo 6. Anexo

Como punto adicional, se adjunta una nota corta donde se presentan los resultados de una exploración de las bacterias *Ehrlichia* y *Coxiella* en las muestras obtenidas en équidos.

Capítulo 1.

Los équidos como centinelas de bacterias transmitidas por garrapatas

Resumen

En el continente americano los équidos, entre los cuales se incluyen los caballos, asnos y sus híbridos, las mulas; son parasitados por diversas especies de garrapatas duras de los géneros *Amblyomma*, *Dermacentor*, *Ixodes* y *Rhipicephalus*, siendo más frecuentes en América las infestaciones por las especies del complejo *Amblyomma cajennense* y *Dermacentor nitens*. Las garrapatas son consideradas unas de las principales fuentes de transmisión de bacterias, de las cuales se tienen como principales representantes a las rickettsiales (*Rickettsia* spp., *Anaplasma phagocytophilum*, *Ehrlichia* spp.), *Borrelia burgdorferi* y *Coxiella burnetii*, las cuales se encuentran vinculadas con los équidos. Estos agentes son importantes debido a pueden producir enfermedades zoonóticas emergentes y reemergentes que pueden afectar la salud de diversos animales, incluyendo el hombre.

En la presente revisión se exploran a los équidos como centinelas de bacterias transmitidas por garrapatas, a través del abordaje de aspectos biológicos, ecológicos y epidemiológicos en América. Los équidos al ser parasitados por diversas especies de garrapatas e infectados con los microorganismos que estas le transmiten, pueden ser de utilidad como centinelas de la circulación de estos agentes patógenos y este conocimiento a su vez, podría apoyar procesos de vigilancia, prevención y control de las enfermedades en la población humana y animal.

Palabras claves

Artrópodos hematófagos, Ixodidae, Rickettsiales, Vectores, Vigilancia epidemiológica

Introducción

El término équido hace referencia a los animales perteneciente a la familia Equidae, que taxonómicamente se clasifican en el reino Animalia, Filo Chordata, Clase Mammalia, orden Perissodactyla; e incluye a animales domésticos como los caballos (*Equus ferus caballus*), asnos (*Equus africanus asinus*) y sus híbridos conocidos como mulas (*Equus asinus x Equus caballus*) [1,2].

La domesticación de los équidos se inició hace millones de años en regiones de África y Europa; en el continente americano estos animales fueron introducidos desde la época de

la conquista y han sido mantenidos con diversos fines zootécnicos, tales como animales de abasto, carga, transporte, deporte y exposición, entre otras [3].

Al igual que otros animales domésticos, los équidos pueden padecer diversos procesos parasitarios, entre los cuales se encuentran las infestaciones por garrapatas, las cuales pueden generar daños directos en la piel y anemia dado su comportamiento hematófago, e indirectos por infecciones secundarias producidas por patógenos bacterianos, virales o parasitarios [4].

En el panorama mundial, el reporte de los patógenos transmitidos por garrapatas va en aumento, lo cual implica riesgos para la salud humana y animal [5]. En el estudio de estas enfermedades se ha propuesto la necesidad de un abordaje holístico como el de “Una Salud” (One Health), que se enriquece desde los campos de la epidemiología, el diagnóstico, el tratamiento, la descripción de hospederos y vectores, la prevención y el control, entre otros [6].

El conocimiento de los agentes transmitidos por garrapatas en América presenta diversos grados de desarrollo y ha sido impulsado entre otras razones, por su emergencia y reemergencia, como ha sido el caso de la fiebre manchada causada por *Rickettsia rickettsii*. Países como Canadá, Estados Unidos y Brasil son los líderes en este campo, mientras que en el resto del continente el conocimiento aún es incipiente. Esta situación hace necesaria la aplicación de diversos sistemas de vigilancia epidemiológica en aras de reconocer zonas de riesgo de circulación de los agentes arriba mencionados. Una manera adicional a la vigilancia activa y pasiva para conocer estas áreas es la utilización de animales domésticos y de compañía como centinelas [6–8].

El termino centinela en este contexto, hace referencia a aquellos animales que son susceptibles de sufrir la infección por agentes transmitidos por garrapatas y generan una respuesta clínica o serológica medible. La aplicación de animales centinelas permite la identificación de brotes, la comprobación de la efectividad de programas de intervención suministra información sobre la distribución geográfica, los cambios en la incidencia y los factores de riesgo [7,9]. Los animales domésticos y de compañía son comúnmente utilizados como centinelas debido a que comparten con los humanos el mismo ambiente, están expuestos a los mismos agentes infecciosos y pueden ser parasitados por las mismas garrapatas vectoras [10].

En los équidos se han reportado agentes bacterianos transmitidos por garrapatas, tales como *Borrelia burgdorferi*, *Rickettsia* spp., *Anaplasma phagocytophilum*, *Ehrlichia* spp., y

Coxiella burnetii, los cuales pueden infectarlos, generar la enfermedad o una respuesta inmunológica [11–13] (Tabla 1-1 y Figura 1-1). Esta última razón hace que los équidos sean potencialmente utilizados como centinelas de estas infecciones, con razones adicionales como que a) son animales parasitados por múltiples especies de garrapatas potenciales vectores de agentes b) a que están en constante contacto con la naturaleza y vegetación donde se dan la mayoría de los ciclos de las garrapatas, y c) a que pueden servir de transporte mecánico de estos artrópodos, lo cual hace de los équidos una fuente potencial de garrapatas vectoras para animales, incluyendo el hombre [11].

Con base en los anteriores elementos, en esta revisión se explora a los équidos como centinelas de bacterias transmitidas por garrapatas a través del abordaje de aspectos biológicos, ecológicos y epidemiológicos en América. Esta información tiene como propósito resaltar la importancia de los équidos como un apoyo al conocimiento de la epidemiología, vigilancia, prevención y control de los agentes transmitidos por garrapatas en la población humanas y animales, a través de su utilización como centinelas.

Principales garrapatas que parasitan équidos en América

Las garrapatas son ectoparásitos hematófagos de vertebrados terrestres (incluyendo las aves) de una amplia distribución mundial. Se clasifican como artrópodos de la clase Arácnida, del orden Acari, suborden Ixodida que a su vez se divide en tres familias: Ixodidae (garrapatas duras), Argasidae (garrapatas blandas) y Nuttalliellidae [24].

Las garrapatas duras suelen ser las más reportadas en los équidos, si bien entre las blandas, la especie *Otobius megnini* también se ha reportado causando daño en el oído interno y transmitiendo agentes infecciosos [25].

Entre las garrapatas duras que infestan a équidos en América se reconoce la circulación de los géneros *Haemaphysalis*, *Ixodes*, *Dermacentor*, *Amblyomma* y *Rhipicephalus* [26]. Las principales especies reportadas corresponden a las del complejo *A. cajennense* (*Amblyomma mixtum*, *Amblyomma tonelliae*, *A. cajennense* sensu stricto, *Amblyomma interandinum*, *Amblyomma sculptum* y *Amblyomma patinoi*) [27,28] y *Dermacentor nitens* (antes nombrada *Anocentor nitens*), especialmente en Centro y Suramérica. No obstante, también se han reportado, la garrapata del ganado *Rhipicephalus microplus*, especies del complejo *Ixodes ricinus*, *Amblyomma americanum*, *Dermacentor variabilis* y *Amblyomma maculatum*, entre otras [29,30].

Tabla 1-1. Información general de las bacterias transmitidas por garrapatas reportados en équidos del continente americano.

Agente	Garrapata implicada	Enfermedad en el equino	Distribución del agente*	Referencias
<i>Borrelia burgdorferi sensu lato</i>	Complejo <i>Ixodes ricinus</i> (<i>Ixodes pacificus</i> , <i>Ixodes scapularis</i>)	Enfermedad de Lyme	Canadá Estados Unidos México Brasil Argentina	[14–18]
<i>Rickettsia</i> spp.	Complejo <i>Amblyomma cajennense</i> <i>Amblyomma triste</i> <i>Amblyomma aureolatum</i> <i>Amblyomma maculatum</i> <i>Amblyomma ovale</i> <i>Dermacentor andersoni</i> <i>Dermacentor variabilis</i>	No descrita	Canadá Estados Unidos México Costa Rica Panamá Colombia Brasil Argentina Uruguay	[19,20]
<i>Anaplasma phagocytophilum</i>	Complejo <i>Ixodes persulcatus</i> En Suramérica se sospecha del complejo <i>Amblyomma cajennense</i> y <i>Rhipicephalus sanguineus</i> s.l.	Anaplasmosis granulocítica	Canadá Estados Unidos Guatemala Colombia Brasil	[11,21]
<i>Ehrlichia</i> spp.	Garrapatas de los géneros <i>Amblyomma</i> y <i>Rhipicephalus</i>	Se desconoce	Norte, centro y Suramérica	[22]
<i>Coxiella burnetii</i>	Familia <i>Ixodidae</i>	Fiebre Q	Canadá Estados Unidos México Colombia Brasil Uruguay Argentina	[23]

* Definida a través de evidencia clínica, serológica o molecular en diversos hospederos.

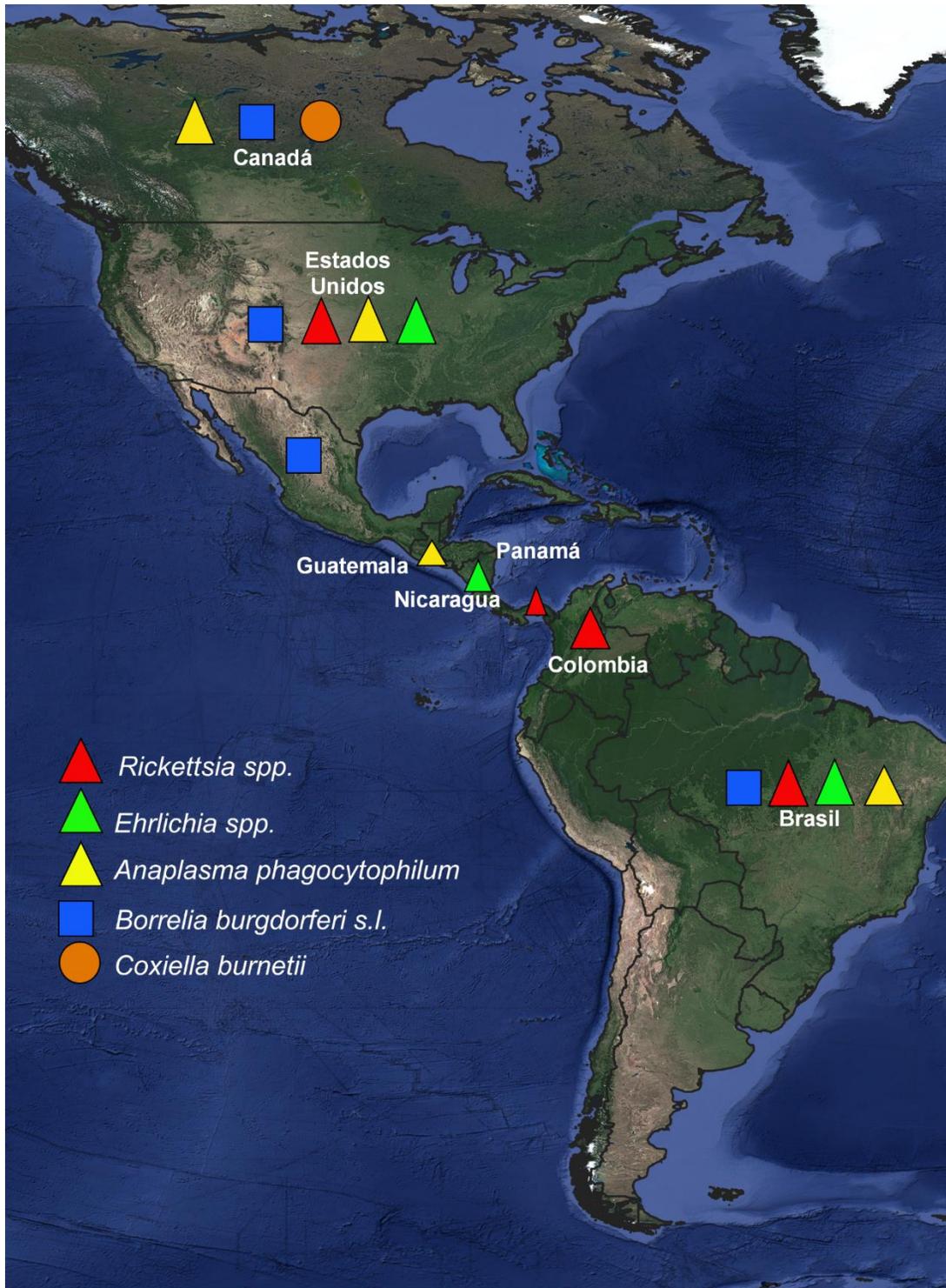


Figura 1-1. Países donde se han dado reportes de bacterias transmitidas por garrapatas en équidos del continente americano.

El complejo *A. cajennense* es vector reconocido de *R. rickettsii* y vector sospechoso de otros agentes tales como *R. amblyommatis*, *Ehrlichia* spp., *T. equi*, *C. burnetii* y el virus de la encefalitis equina venezolana [13,31–34]; mientras que *D. nitens*, se ha reconocido como vector de *B. caballi*, agente causal de la piroplasmosis equina; además se puede ver infectada con otros agentes, como Bermúdez y colaboradores en Panamá lo demostraron a través pruebas moleculares, en donde encontraron material genético de *R. rickettsii* en esta garrapata [35].

En Colombia se han reportado en équidos diversas especies de garrapatas, entre las cuales se incluyen a *A. cajennense* s.l. y sus especies *A. mixtum* y *A. patinoi*, *D. nitens*, *Rh. microplus*, *Rh. sanguineus* s.l., *A. ovale*, *A. maculatum*, *A. neumanni*, *Ixodes affinis* e *Ixodes pararicinus* [36,37].

Principales bacterias transmitidas por garrapatas a los équidos

Las principales bacterias transmitidas por garrapatas a los équidos en el continente americano corresponden a las familias Rickettsiae, Anaplasmataceae, Borreliaceae, y Coxiellaceae, algunas de las cuales pueden causar potencialmente enfermedades e infecciones en los équidos (Figura 1-1).

***Rickettsia* spp.**

Rickettsia es un género de bacterias Gram negativas en forma de cocobacilos (0,3 a 1 um) que se clasifican en el filo Proteobacterias, clase Alfabroteobacterias, orden *Rickettsiales* y familia Rickettsiaceae [19]. Son bacterias intracelulares obligadas que parasitan células eucariotas y que tiene como principal célula blanco el endotelio vascular [38].

Según características antigénicas y moleculares, las especies de *Rickettsia* se agrupan en cuatro categorías: el grupo tifo conformado por *Rickettsia prowazekii* y *Rickettsia typhi*, el grupo ancestral donde destacan *Rickettsia belli* y *Rickettsia canadensis*, el grupo transicional compuesto principalmente por *Rickettsia akari*, *Rickettsia australis* y *Rickettsia felis*, y el grupo de las fiebres manchadas (GFM) [39]. Este último grupo está constituido por más de 20 especies y se tienen algunas en estado de candidatas. Este grupo reviste especial importancia por ser transmitido por garrapatas y estar conformado por algunas rickettsias patógenas, tales como *R. rickettsii* y *Rickettsia conorii*, entre otras, que causan diferentes enfermedades potencialmente mortales como la fiebre manchada de las Montañas Rocosas (FMMR) y fiebre manchada del Mediterráneo, respectivamente [40].

El ciclo de la bacteria es enzoótico e involucra el mantenimiento de la bacteria en la garrapata y en mamíferos. Las principales garrapatas involucradas como vectores son de los géneros *Dermacentor*, *Rhipicephalus* y *Amblyomma*, las cuales mantienen de forma trans-estadial y transovárica a la bacteria [26]. Para completar el ciclo de la bacteria, el vector la transmite a mamíferos que pueden ser silvestres, sinantrópicos y domésticos.

Hasta finales del siglo pasado la única *Rickettsia* del GFM patógena que había sido reconocida en el continente americano era *R. rickettsii*, posteriormente se reportaron otras especies de menor virulencia como *R. parkeri* s.l. y su cepa cepa Atlantic rainforest [41–43]. Estas especies de *Rickettsia* han sido reportadas en Estados Unidos, Colombia, Brasil, Argentina y Uruguay, en las garrapatas *Amblyomma maculatum*, *Amblyomma triste* y *A. ovale* [42–46]. En años recientes han surgido otras especies con capacidad patogénica aún en discusión, como es el caso de *Rickettsia amblyommatis*; en la que se han asociado como vectores las garrapatas de la familia Ixodidae. *R. rickettsii* es la bacteria más virulenta del GFM y es el agente etiológico de la FMMR, que también ha recibido como denominación Fiebre de Tobia en Colombia y Fiebre moteada Brasileira [40]. Esta enfermedad a su vez es considerada una zoonosis importante en salud pública, presentando porcentajes de letalidad menores al 0.5% en países como Estados Unidos hasta de 54% en Colombia [47,48]. Esta bacteria tiene distribución a través del continente americano en varios países tales como Canadá, Estados Unidos, México, Costa Rica, Panamá, Colombia, Brasil y Argentina, donde es transmitida a diferentes hospederos por las garrapatas *Dermacentor variabilis* y *Dermacentor andersoni* en Norteamérica, *Rh. sanguineus* s.l. en el sur de Estados Unidos y México, el complejo de *A. cajennense* en centro y Suramérica, y *Amblyomma aureolatum* en Brasil [40,49].

Los équidos en la región neotropical son comúnmente infestados por garrapatas tales como *A. cajennense* s.l., por lo que pueden llegar a infectarse con *R. rickettsii* y con otras especies de rickettsias del GFM, como lo evidencian estudios serológicos, donde se han hallado frecuencias variables y que sugieren áreas endémicas y no endémicas para rickettsias transmitidas por *A. cajennense* s.l., e incluso han sugerido que valores superiores al 40% pueden indicar zonas endémicas [50] (Tabla 1-2). Los datos previos soportan la idea de utilizar a estos animales, especialmente los caballos, como centinelas para las rickettsias transmitidas por especies del complejo *A. cajennense*, es decir que son indicadores de la circulación del agente en zonas de potencial transmisión humana.

Vale aclarar que, aunque los caballos se infectan con *Rickettsia* spp. y sufren seroconversión, estudios de infección experimental con *R. rickettsii* en Brasil, indican que ellos no sufren la enfermedad, signos clínicos o rickettsemia cuando son infectados. No obstante, recientemente en Estados Unidos se ha sospechado de algunos casos clínicos en estos animales [20,51].

Tabla 1-2. Estudios serológicos contra el GFM de *Rickettsia* en équidos de Centro y Suramérica (n+=animales positivos, N=Total de animales analizados).

País	Sitio de estudio	n+(%)	N	Referencia
Brasil	Pedreira-Sao Paulo	7(77.8)	9	[52]
	Sao Paulo	17(77.3)	22	[53]
	Área no endémica Sao Paulo	0(0)	47	[54]
	Área endémica Sao Paulo	17(77.3)	22	
	Minas Gerais-Caratinga	3(17)	18	[55]
	São José dos Pinhais-Paraná	9(10.8)	83	[56]
	Sao Paulo	62(73)	85	[50]
	Minas Gerais-Itabira	14(100)	14	[57]
	Vale de Paraíba-Rio de Janeiro	15(44.1)	34	[58]
	Pingo D'Água	16(38.1)	42	[59]
	Santa Cruz do Escalvado	10(15.2)	66	
	Minas Gerais-Santa Cruz	3 (8.1)	37	[60]
	Paraná	7(9.33)	75	[61]
	Almirante Tamandaré- Paraná	6(8.5)	71	[62]
	Espírito Santo	7(27.5)	27	[63]
	Paraná	15 (5.88)	255	[64]
	Juiz de Fora	16(41)	39	[65]
	Cerro Largo, Rio Grande do Sul	16(51.6)	31	[66]
	Jardim California- Paraná	10(38.5)	26	[67]
	Alvorada do Sul	10(55,6)	19	[68]
	Arapongas	1(5.5)	18	
	Piauí	125(52.3)	239	[69]
	Pará	85(19.5)	436	[70]
	Santa Catarina	28(18.7)	150	[71]
	Pantanal	337 (61.6)	547	[13]
	Caratinga-Minas Gerais	9 (9.4)	98	[72]
	Serópedica-Rio de Janeiro	35(83.3)	42	[73]
	Rio de Janeiro	14(82.3)	17	[74]
	Paulicéia-Sao Paulo	35(25)	140	[75]
	Sao Paulo	64(17.6)	363	[76]
Área endémica Piracicaba	110(44.5)	247	[77]	
Área no endémica Piracicaba	73(28.4)	257		
Maranhão	152(58.9)	258	[78]	
Espírito Santo	2(20)	10	[79]	
Bahía	17(24.6)	69	[80]	
Colombia	Llanos Orientales	7(2.85)	246	[81]
	Villeta-Cundinamarca	25(33.8)	74	[82]
	Villeta-Cundinamarca	26(16.3)	159	[83]
	Urabá antioqueño	58(45.7)	127	[84]
	Urabá antioqueño	42(30.9)	136	[85]
	El Tambo-Cauca	33(84.6)	39	[86]
Panamá	El Valle de Antón, Coclé	14(70)	20	[87]

Anaplasma phagocytophilum

Bacteria Gram negativa intracelular obligada del filo Proteobacteria; orden Rickettsiales, familia Anaplasmataceae, pleomórfica con un tamaño variable entre 0.2–1.6 μm que tiene como células blanco los neutrófilos. En la célula blanco forma dos tipos de estructuras conocidas como mórulas las cuales corresponden a macro-colonias y los cuerpos reticulares, los cuales son formas pequeñas y densas. *A. phagocytophilum* es el agente causal de la anaplasmosis granulocítica que previamente era nombrada como ehrlichiosis granulocítica, ya que se encontraba clasificada en el género *Ehrlichia* con los nombres científicos de *Ehrlichia phagocytophila* o *Ehrlichia equi* [22,88].

La bacteria es cosmopolita, reconocida como zoonótica y puede afectar un amplio rango de hospederos silvestres, sinantrópicos y domésticos, verbigracia rumiantes, caninos, équidos, roedores pequeños e incluso a los seres humanos. El mantenimiento de su ciclo en algunos países es similar a la enfermedad de Lyme, ya que sus reservorios son *Peromyscus leucopus* (ratón de patas blancas) y *Odocoileus virginianus* (venado de cola blanca), además su transmisión es dada por garrapatas del género *Ixodes*, tales como especies del complejo *I. ricinus*. A diferencia de *Rickettsia* spp., *A. phagocytophilum* presenta transmisión trans-estadial, pero no trans-ovárica, por lo cual su ciclo depende de la bacteremia persistente y de la infección en una alta proporción de los hospederos y garrapatas [89].

La anaplasmosis granulocítica es una de las enfermedades del orden rickettsiales más severas en los équidos. Los animales presentan signos clínicos de fiebre, apatía, anemia, cojera, trombocitopenia y leucopenia, los cuales pueden conllevar a muerte del animal por hemorragias, trombosis, lesiones vasculares proliferativas y necrotizantes, entre otras [90,91]. El tratamiento de elección es la administración de antibióticos, como la doxiciclina y las oxitetraciclinas [92].

En América la infección en los équidos se ha reportado en Canadá, Estados Unidos, Guatemala y Brasil, pero en el resto del continente su estudio es incipiente, pese a que se reconoce por estudios serológicos y moleculares, la circulación de la bacteria en humanos y en otros animales [93–96]. Por ejemplo, en Brasil se ha detectado en caninos y en las garrapatas *A. cajennense* y *Rh. sanguineus* s.l. [96,97] y en Colombia se ha reportado una seroreactividad del 20% en humanos [98]. Estos hallazgos indican la necesidad de explorar la eco-epidemiología de *A. phagocytophilum* en el continente americano y es posible suponer que, al igual que lo declarado por Mauro y colaboradores en Italia, los

équidos podrían ser considerados como centinelas epidemiológicos, dada su sólida y concreta respuesta inmunológica contra *A. phagocytophilum* [99].

***Ehrlichia* spp.**

El género *Ehrlichia* se compone de bacterias Gram negativas intracelulares obligadas, que al igual que el género *Anaplasma*, se clasifican en el filo Proteobacteria, orden *Rickettsiales*, familia *Anaplasmataceae* y que afectan las células leucocitarias como neutrófilos o mononucleares. Son bacterias pleomórficas que forman mórulas y cuerpos reticulares. En este género se encuentran las especies *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia chaffeensis*, *Ehrlichia ewingii*, *Ehrlichia muris*, *Ehrlichia minesensis* y *Ehrlichia ruminantium*, las cuales tienen ciclos enzoóticos que involucran la transmisión por diversas especies de garrapatas del género *Amblyomma* y *Rhipicephalus* [100].

Este género tiene una distribución mundial y afecta diversos animales silvestres, domésticos e incluso el hombre, causando entidades como la Ehrlichiosis Monocítica Humana por *E. chaffeensis* y la Ehrlichiosis canina por *E. canis* [22].

En el continente americano se ha reportado diversas seropositividades en humanos y caninos, hallazgos moleculares e incluso aislamiento de la bacteria en diversos animales y garrapatas [101–104]. En los équidos no se han reportado enfermedades por *Ehrlichia* spp. y estos animales tampoco se han relacionado como hospederos de esta bacteria, aunque se han encontrado evidencias serológicas y moleculares de su infección. En Estados Unidos se han encontrado équidos seroreactivos en Oklahoma con frecuencias del 8.75 (21/240) y 24.7% (18/73) [29,105]. En Brasil se han encontrado équidos reactivos para *Ehrlichia* entre 27.4% (52/190) y 62.5% (10/16), e incluso ADN de este género [106,107]. En Nicaragua se encontró un 55% (51/92) de animales positivos por pruebas serológicas y en cuatro de estos caballos, ADN de una nueva especie de *Ehrlichia* con desconocido potencial patogénico [108]. Estudios recientes sugieren que los hallazgos moleculares de Nicaragua y Brasil son similares, sugiriendo la circulación de la misma bacteria [109]. Estas evidencias indican la circulación de la bacteria, aunque con un panorama por explorar.

***Borrelia burgdorferi* s.l.**

Borrelia burgdorferi es un complejo de bacterias Gram negativas del orden Spiroquetales y familia Borreliaceae, de forma de espiral y con un tamaño entre 0,2-0,5 μm de ancho y 10-30 μm de largo [88]. Las especies más reconocidas son *B. burgdorferi* sensu stricto en Norteamérica y *Borrelia afzelii*, *Borrelia garinii*, *B. burgdorferi*, *Borrelia spielmanii*, y

Borrelia bavariensis en Europa [15]. Esta bacteria es el agente causal de la enfermedad de Lyme, la cual es una de las infecciones transmitidas por garrapatas más comunes en el mundo y que tradicionalmente se ha reportado en zonas templadas del hemisferio norte [88].

La enfermedad es mantenida en la naturaleza en ciclos enzoóticos que involucran garrapatas del género *Ixodes* y mamíferos. En Canadá y Estados Unidos el vector son las garrapatas del complejo de *I. ricinus*, específicamente *Ixodes pacificus* en la costa oeste e *Ixodes scapularis* en la costa este [15]. Entre los mamíferos involucrados se incluyen los venados y roedores pequeños como el ratón de patas blancas. En el ciclo de la enfermedad, otros mamíferos pueden ingresar de manera accidental como es el caso del hombre y animales domésticos. En el hombre y en otros animales, la enfermedad es multisistémica y se presenta con alteraciones a nivel cutáneo, nervioso, articular e incluso cardíaco [15].

La bacteria en zonas endémicas puede afectar caballos, asnos y mulas. En estos animales, la infección se da posterior a la transmisión por las garrapatas adultas infectadas durante procesos de fijación y alimentación por tiempo superiores a 24 horas [14]. Las manifestaciones clínicas son múltiples y pueden ser leves o severas, como por ejemplo pérdida de peso, cojera esporádica, rigidez, artritis, hinchazón de las articulaciones, dolor muscular, hepatitis, laminitis, fiebre, aborto, uveítis; y manifestaciones neurológicas como encefalitis e incluso neuro-borreliosis [110].

La transmisión de la enfermedad de Lyme en humanos o en équidos de América se ha reconocido en Canadá y Estados Unidos [14]. En otros países del continente tales como Argentina, Colombia, Brasil, Bolivia, Chile, México, Perú y Venezuela, se han dado reportes de la enfermedad de Lyme por clínica y pruebas serológicas [18,111–114], incluso en Brasil se ha designado como un síndrome similar a Lyme o síndrome de Baggio-Yoshinari [115]. Pese a la evidencia clínica y serológica en Suramérica, hasta hace poco tiempo la búsqueda de la bacteria había sido infructuosa [116]. Estudios en los últimos años han revelado la presencia de la bacteria por pruebas moleculares e inmunohistoquímica en Brasil, México y Argentina [16–18], lo cual puede indicar la necesidad de ampliar el panorama epidemiológico y la investigación sobre esta enfermedad en el continente, dada su circulación.

Coxiella burnetii

Es una bacteria pleomórfica con un tamaño de 0.3 a 0.7 μm , intracelular obligada, Gram negativa del filo Proteobacteria; orden Legionellales y familia Coxiellaceae, que puede ser transmitida por garrapatas pero que principalmente se transmite por otras vías, como por contacto con aerosoles y membranas fetales, fluidos vaginales, leche y demás excreciones de animales infectados. La bacteria se ha reportado en todos los géneros de garrapatas de la familia *Ixodidae* (*Ixodes*, *Rhipicephalus*, *Hyalomma*, *Haemaphysalis*, *Dermacentor* y *Amblyomma* [88].).

Los bovinos, caprinos y ovinos son los animales domésticos comúnmente infectados, pero también se ha reportado en gatos, caballos, caninos, conejos, cerdos y animales silvestre, los cuales pueden dispersar la bacteria a otros animales e incluso al hombre [23].

La fiebre Q es la enfermedad causada por *C. burnetii*. Tiene una distribución mundial y se caracteriza por afectar diferentes mamíferos en los cuales puede cursar de forma subclínica o causar muy manifestaciones variadas. En los humanos puede presentarse con fiebre autolimitada, neumonía, endocarditis, hepatitis, encefalitis, entre otras manifestaciones. En América se ha reportado en países como Canadá, Estados Unidos, México, Colombia, Brasil, Argentina y Uruguay, a través de serología y clínica en humanos y animales domésticos [23,117]

En los équidos las infecciones con *C. burnetii* han sido poco investigadas. Las manifestaciones reproductivas como el aborto son las más reportadas, y a través de infecciones experimentales, se han reconocido otras como la fiebre, la depresión, la conjuntivitis, la gastritis catarral, la enteritis y las infecciones pulmonares [118,119].

En América se reconoce la circulación de la bacteria en varios animales domésticos, pero son escasos los estudios en los équidos. Uno de los pocos estudios realizados se desarrolló en Canadá donde se reportó una frecuencia de 0,1% caballos seropositivos [119]. La presencia de esta bacteria en los équidos debe sugerir la vigilancia de la fiebre Q, ya que pueden ser una fuente de infección para otros animales incluyendo el hombre.

Conclusiones

Los hallazgos de esta revisión muestran la diversidad de especies de bacterias que pueden ser transmitidas por garrapatas en équidos del continente americano. Se reconoce el papel potencial de los équidos como centinelas, en los casos de *B. burgdorferi*, *Rickettsia* spp y *A. phagocytophilum*. La denominación de centinelas permitiría detectar potenciales áreas de riesgo para la circulación de estos agentes. Se

debe explorar el papel en los équidos de los demás agentes bacterianos transmitidos por garrapatas como *Ehrlichia* spp. y *C. burnetii*

Se evidencia de manera general el desconocimiento del panorama epidemiológico en el campo de la salud humana y equina de los agentes bacterianos transmitidos por garrapatas en América, lo cual abre la posibilidad de su exploración, descripción y vigilancia. Esto se aplica especialmente para Colombia donde el conocimiento es incipiente y requiere de mayores estudios desde los enfoques eco-epidemiológicos que ofrezcan un abordaje holístico y un enfoque de Una Salud, particularmente utilizando herramientas estratégicas como la vigilancia centinela.

La emergencia de algunos de estos agentes soporta la necesidad de la vigilancia epidemiológica en los hospederos, con el fin de generar medidas de prevención y control de este tipo de infecciones que pueden afectar la salud humana y animal.

Referencias

- [1] Hunt K. Horse evolution. 1995 2015:10. http://www.talkorigins.org/faqs/horses/horse_evol.html (accessed July 5, 2019).
- [2] Soukhanov AH. The American Heritage Dictionary of the English Language. 3rd ed. Michigan: Houghton Mifflin Harcourt; 1992.
- [3] Burcher P. Origen de los animales domésticos: Una visión arqueológica. Medellín: 1996.
- [4] Cordero M, Rojo FA, Martínez A, Sanchez C, Hernandez S, Navarrete I, et al. Parasitología Veterinaria. España: MacGraw-Hill Interamericana; 1999.
- [5] De la Fuente J, Estrada-Peña A. Ticks and tick-borne pathogens on the rise. Ticks Tick Borne Dis 2012;3:115–6. doi:10.1016/j.ttbdis.2012.03.001.
- [6] Dantas-Torres F, Chomel BB, Otranto D. Ticks and tick-borne diseases: A One Health perspective. Trends Parasitol 2012;28:437–46. doi:10.1016/j.pt.2012.07.003.
- [7] Schmidt PL. Companion Animals as Sentinels for Public Health. Vet Clin North Am - Small Anim Pract 2009;39:241–50. doi:10.1016/j.cvsm.2008.10.010.
- [8] Organización Panamericana de la salud ., Organización Mundial de la Salud . Unidad 4: Vigilancia en salud pública. Módulos principios Epidemiol. para el Control enfermedades, vol. 31, Washington DC: OPS; 2011, p. 54.
- [9] Vu Hai V, Almeras L, Socolovschi C, Raoult D, Parola P, Pagès F. Monitoring

- human tick-borne disease risk and tick bite exposure in Europe: Available tools and promising future methods. *Ticks Tick Borne Dis* 2014;5:607–19. doi:10.1016/j.ttbdis.2014.07.022.
- [10] Reif JS. Animal sentinels for environmental and public health. *Public Health Rep* 2011;126 Suppl:50–7.
- [11] Onmaz AC, Beutel RG, Schneeberg K, Pavaloiu AN, Komarek A, Van Den Hoven R. Vectors and vector-borne diseases of horses. *Vet Res Commun* 2013;37:65–81. doi:10.1007/s11259-012-9537-7.
- [12] Klaus C, Hörügel U, Hoffmann B, Beer M. Tick-borne encephalitis virus (TBEV) infection in horses: Clinical and laboratory findings and epidemiological investigations. *Vet Microbiol* 2013;163:368–72. doi:10.1016/j.vetmic.2012.12.041.
- [13] Alves ADS, Melo ALT, Amorim M V., Borges AMCM, Silva LGE, Martins TF, et al. Seroprevalence of *Rickettsia* spp. in Equids and Molecular Detection of ‘Candidatus *Rickettsia amblyommii*’ in *Amblyomma cajennense* Sensu Lato Ticks From the Pantanal Region of Mato Grosso, Brazil. *J Med Entomol* 2014;51:1242–7. doi:10.1603/me14042.
- [14] Divers TJ. Equine lyme disease. *J Equine Vet Sci* 2013;33:488–92. doi:10.1016/j.jevs.2013.03.187.
- [15] Stanek G, Wormser GP, Gray J, Strle F. Lyme borreliosis. *Lancet* 2012;379:461–73. doi:10.1016/S0140-6736(11)60103-7.
- [16] Talhari S, de Souza Santos MN, Talhari C, de Lima Ferreira LC, Silva RM, Zelger B, et al. *Borrelia burgdorferi* “sensu lato” in Brazil: Occurrence confirmed by immunohistochemistry and focus floating microscopy. *Acta Trop* 2010;115:200–4. doi:10.1016/j.actatropica.2010.02.017.
- [17] Nava S, Barbieri A, Maya L, Colina R, Mangold AJ, Labruna MB, et al. *Borrelia* infection in *Ixodes pararicinus* ticks (Acari: Ixodidae) from northwestern Argentina. *Acta Trop* 2014;139:1–4. doi:10.1016/j.actatropica.2014.06.010.
- [18] Gordillo-Pérez G, Solórzano-Santos F. Enfermedad de Lyme. Experiencia en niños mexicanos. *Bol Med Hosp Infant Mex* 2007;67:530–5.
- [19] Oteo JA, Nava S, Sousa R de, Mattar S, Venzal JM, Abarca K, et al. Guías Latinoamericanas de la RIICER para el diagnóstico de las rickettsiosis transmitidas

por garrapatas. Rev Chil Infectología 2014;31:54–65.

- [20] Ueno TEH, Costa FB, Moraes-Filho J, Agostinho WC, Fernandes WR, Labruna MB. Experimental infection of horses with *Rickettsia rickettsii*. Parasites and Vectors 2016;9:499. doi:10.1186/s13071-016-1784-y.
- [21] Ogden NH, Lindsay LR, Hanincová K, Barker IK, Bigras-Poulin M, Charron DF, et al. Role of migratory birds in introduction and range expansion of *Ixodes scapularis* ticks and of *Borrelia burgdorferi* and *Anaplasma phagocytophilum* in Canada. Appl Environ Microbiol 2008;74:1780–90. doi:10.1128/AEM.01982-07.
- [22] Ismail N, Bloch KC, McBride JW. Human ehrlichiosis and anaplasmosis. Clin Lab Med 2010;30:261–92. doi:10.1016/j.cll.2009.10.004.
- [23] Contreras V, González M, Guzmán C, Máttar S. Fiebre Q: una zoonosis olvidada en Colombia Q fever: a neglected zoonosis in Colombia. Rev Med Risaralda 2013;19:137–46.
- [24] Sonenshine DE. Ticks. In: Resh V, Cardé R, editors. Encycl. Insects. Second, San Diego: Academic Press; 2009, p. 1003-1101. doi:10.1016/B978-0-12-374144-8.00264-2.
- [25] Eads RB, Campos EG. Human parasitism by *Otobius megnini* (Acari: Argasidae) in New Mexico, USA. J Med Entomol 1984;21:244.
- [26] Barros Battesti D, Arzua M, Bechara GH, Barros-Battesti D, Arzua M, Bechara GH. Carrapatos De Importancia Médico-veterinaria Da Regiao Neotropical: Um Guia Ilustrado Para Identificação De Espécies. São Paulo, Brasil: Vox/ICTTD-3/Butantan; 2006.
- [27] Nava S, Beati L, Labruna MB, Cáceres AG, Mangold AJ, Guglielmone AA. Reassessment of the taxonomic status of *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) with the description of three new species, *Amblyomma tonelliae* n. sp., *Amblyomma interandinum* n. sp. and *Amblyomma patinoi* n. sp., and reinstatement of *Amblyomma mixtum* Koch, 1. Ticks Tick Borne Dis 2014;5:252–76. doi:10.1016/j.ttbdis.2013.11.004.
- [28] Beati L, Nava S, Burkman EJ, Barros-Battesti DM, Labruna MB, Guglielmone A a, et al. *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae), the Cayenne tick: phylogeography and evidence for allopatric speciation. BMC Evol Biol 2013;13:267.

doi:10.1186/1471-2148-13-267.

- [29] Duell JR, Carmichael R, Herrin BH, Holbrook TC, Talley J, Little SE. Prevalence and species of ticks on horses in central Oklahoma. *J Med Entomol* 2013;50:1330–3.
- [30] Guglielmone A, Estrada-Peña A, Keirans J, Robbins R. Ticks (Acari: Ixodida) of the Neotropical Zoogeographic Region. Atlanta: International Consortium of Ticks and Tick-borne Diseases ICTTD-2; 2003.
- [31] Linthicum KJ, Anyamba A, Chretien J, Small J, Tucker CJ, Britch SC. *Vector Biology, Ecology and Control* 2010:3–13. doi:10.1007/978-90-481-2458-9.
- [32] Sanders DM, Parker JE, Walker WW, Buchholz MW, Blount K, Kiel JL. Field collection and genetic classification of tick-borne rickettsiae and rickettsiae-like pathogens from south Texas: *Coxiella burnetii* isolated from field-collected *Amblyomma cajennense*. *Ann N Y Acad Sci* 2008;1149:208–211. doi:10.1196/annals.1428.022.
- [33] Patino-Camargo L. Nuevas observaciones sobre un tercer foco de fiebre petequial (maculosa) en el hemisferio americano. *Boletín La Of Sanit Panam* 1941;20:1112–24.
- [34] Scoles GA, Ueti MW. *Amblyomma cajennense* is an intrastadial biological vector of *Theileria equi*. *Parasites and Vectors* 2013;6:306. doi:10.1186/1756-3305-6-306.
- [35] Bermudez SE, Eremeeva ME, Karpathy SE, Samudio F, Zambrano ML, Zaldivar Y, et al. Detection and identification of rickettsial agents in ticks from domestic mammals in Eastern Panama. *J Med Entomol* 2009;46:856–61. doi:http://dx.doi.org/10.1603/033.046.0417.
- [36] Lopez G. Garrapatas (Acari: Ixodidae y Argasidae) de importancia médica y veterinaria, procedentes de Norte, Centro y Suramérica. Editorial Universidad CES-Universidad de Antioquia; 2017.
- [37] Benavides-Montaña JA, Jaramillo-Cruz CA, Mesa-Cobo NC. Garrapatas Ixodidae (Acari) en el Valle del Cauca, Colombia. *Boletín Científico Cent Museos Mus Hist Nat* 2018;22:131–50.
- [38] Valbuena G, Walker DH. Infection of the endothelium by members of the order Rickettsiales. *Thromb Haemost* 2009;102:1071–9. doi:10.1160/TH09-03-0186.

- [39] Gillespie JJ, Williams K, Shukla M, Snyder EE, Nordberg EK, Ceraul SM, et al. Rickettsia phylogenomics: Unwinding the intricacies of obligate intracellular life. *PLoS One* 2008;3:21–7. doi:10.1371/journal.pone.0002018.
- [40] Dantas-Torres F. Rocky Mountain spotted fever. *Lancet Infect Dis* 2007;7:724–32. doi:S1473-3099(07)70261-X [pii] 10.1016/S1473-3099(07)70261-X.
- [41] Labruna MB, Salim Mattar V, Nava S, Bermudez S, Venzal JM, Dolz G, et al. Rickettsioses in Latin America, Caribbean, Spain and Portugal. *Rev MVZ Cordoba* 2011;16:2435–57.
- [42] Spolidorio M, Labruna M, Mantovani E, Brandão P, Richtzenhain L, Yoshinari N. Novel spotted fever group rickettsiosis, Brazil. *Emerg Infect Dis* 2010;16:521–3. doi:10.3201/eid1603.091338.
- [43] Bartlett JG. Rickettsia parkeri: A newly recognized cause of spotted fever rickettsiosis in the united states. *Infect Dis Clin Pract* 2004;12:261–2. doi:10.1097/01.idc.0000130890.12611.f3.
- [44] Pacheco RC, Venzal JM, Richtzenhain LJ, Labruna MB. Rickettsia parkeri in Uruguay. *Emerg Infect Dis* 2006;12:1804. doi:10.3201/eid1211.060577.
- [45] Nava S, Elshenawy Y, Ereemeeva ME, Sumner JW, Mastropaolo M, Paddock CD. Rickettsia parkeri in Argentina. *Emerg Infect Dis* 2008;14:1894.
- [46] Londoño AF, Díaz FJ, Valbuena G, Gazi M, Labruna MB, Hidalgo M. Infection of Amblyomma ovale by Rickettsia sp. strain Atlantic rainforest, Colombia. *Ticks Tick Borne Dis* 2014;5. doi:10.1016/j.ttbdis.2014.04.018.
- [47] CDC. Rocky Mountain Spotted Fever. *Statistics and Epidemiology* 2013;2014.
- [48] Hidalgo M, Lizarazo D, Ovalle M, Castañeda E, Heredia D, Zambrano P, et al. Brote de rickettsiosis en Los Córdoba, departamento de Córdoba, febrero-marzo 2007. *Inf Quinc Epidemiol Nac* 2007;12:118-20. Spanish.
- [49] Szabo MPJ, Pinter A, Labruna MB. Ecology, biology and distribution of spotted fever tick vectors in Brazil. *Front Cell Infect Microbiol* 2013;3:1–9. doi:10.3389/fcimb.2013.00027.
- [50] Horta MC, Labruna MB, Pinter A, Linardi PM, Schumaker TT. Rickettsia infection in five areas of the state of São Paulo, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2007;102:793–801. doi:10.1590/S0074-02762007000700003.

- [51] Freese S, Sheats MK. A Suspected Case of Rocky Mountain Spotted Fever in an Adult Horse in the Southeastern United States. *J Equine Vet Sci* 2019;78:134–7.
- [52] de Lemos ER, Alvarenga FB, Cintra ML, Ramos MC, Paddock CD, Ferebee TL, et al. Spotted fever in Brazil: a seroepidemiological study and description of clinical cases in an endemic area in the state of São Paulo. *Am J Trop Med Hyg* 2001;65:329–34.
- [53] Horta MC, Labruna MB, Sangioni LA, Vianna MC, Gennari SM, Galvao MA, et al. Prevalence of antibodies to spotted fever group rickettsiae in humans and domestic animals in a Brazilian spotted fever-endemic area in the state of Sao Paulo, Brazil: serologic evidence for infection by *Rickettsia rickettsii* and another spotted fever gro. *Am J Trop Med Hyg* 2004;71:93–7.
- [54] Sangioni LA, Horta MC, Vianna MC, Gennari SM, Soares RM, Galvao MA, et al. Rickettsial infection in animals and Brazilian spotted fever endemicity. *Emerg Infect Dis* 2005;11:265–70. doi:10.3201/eid1102.040656.
- [55] Cardoso LD, Freitas RN, Mafra CL, Neves CVB, Figueira FCB, Labruna MB, et al. Characterization of *Rickettsia* spp. circulating in a silent peri-urban focus for Brazilian spotted fever in Caratinga, Minas Gerais, Brazil. *Cad Saude Publica* 2006;22:495–501. doi:/S0102-311X2006000300004.
- [56] Freitas MCD de. Detecção de rickettsias do grupo febre maculosa em cães e equinos em São José dos Pinhais, pr. Universidade Federal do Paraná, 2007.
- [57] Campostrini M, Vianna B, Horta MC, Sangioni LA, Cortez A, Soares RM. rickettsial Spotted Fever in Capoeirão Village , ITABIRA , Minas Gerais , Brazil 2008;50:297–301.
- [58] Gazeta GS, Souza ER, Abboud-Dutra AE, Amorim M, Barbosa PR, Almeida AB, et al. Potential vectors and hosts of rickettsia spp: epidemiological studies in the Vale do Paraíba, state of Rio de Janeiro/Brazil. *Clin Microbiol Infect* 2009;15:269–70. doi:10.1111/j.1469-0691.2008.02230.x.
- [59] Milagres BS, Padilha AF, Barcelos RM, Gomes GG, Montandon CE, Pena DCH, et al. *Rickettsia* in synanthropic and domestic animals and their hosts from two areas of low endemicity for Brazilian spotted fever in the Eastern Region of Minas Gerais, Brazil. *Am J Trop Med Hyg* 2010;83:1305–7. doi:10.4269/ajtmh.2010.10-0239.

- [60] Pena DCH, Mafra CL, Calic SB, Labruna MB, Milagres BS, Walker DH, et al. Serologic survey for antibodies to *Rickettsia* among domestic and wild animal populations in Brazil. *Clin Microbiol Infect* 2009;15:243–4. doi:10.1111/j.1469-0691.2008.02165.x.
- [61] Freitas MCD de., Grycajuk M, Beltrão M, Bonacin J, Labruna MB, Pacheco RDC, et al. Brazilian spotted fever in cart horses in a non-endemic area in Southern Brazil. *Rev Bras Parasitol Vet, Jaboticabal* 2010;19:130–1. doi:10.4322/rbpv.01902013.
- [62] Gonçalves F, Matos D, Thandile K, Boulsfield L, Pereira S, Soares S, et al. Serological survey of *Rickettsia* sp. in horses and dogs in an non-endemic area in Brazil. *Rev Bras Parasitol Veterinária* 2010;19:205–9.
- [63] Spolidorio MG, Labruna MB, Machado RZ, Moraes-Filho J, Zago AM, Donatele DM, et al. Survey for tick-borne zoonoses in the State of Espírito Santo, Southeastern Brazil. *Am J Trop Med Hyg* 2010;83:201–6. doi:10.4269/ajtmh.2010.09-0595.
- [64] Otomura FH, Sangioni LA, Pacheco RC, Labruna MB, Galhardo JA, Ribeiro MG, et al. Anticorpos anti-rickettsias do grupo da febre maculosa em equídeos e caninos no norte do Estado do Paraná, Brasil. *Arq Bras Med Vet e Zootec* 2010;62:761–4. doi:10.1590/S0102-09352010000300037.
- [65] Pacheco RC, Moraes-Filho J, Guedes E, Silveira I, Richtzenhain LJ, Leite RC, et al. Rickettsial infections of dogs, horses and ticks in Juiz de Fora, southeastern Brazil, and isolation of *Rickettsia rickettsii* from *Rhipicephalus sanguineus* ticks. *Med Vet Entomol* 2011;25:148–55. doi:10.1111/j.1365-2915.2010.00915.x.
- [66] Sangioni LA, Vogel FFS, Cadore GC, Hilger RB, Tonim R, Pacheco RC, et al. Rickettsial infection in Cerro Largo, State of Rio Grande do Sul, Brazil. *Arq Bras Med Veterinária e Zootec* 2011;63:511–4.
- [67] Toledo RS, Tamekuni K, de Freitas Silva Filho M, Haydu VB, Pacheco RC, Labruna MB, et al. Study of infection by *Rickettsiae* of the spotted fever group in humans and ticks in an urban park located in the City of Londrina, State of Paraná, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop* 2011;44:313–7. doi:10.1590/S0037-86822011005000037.
- [68] Tamekuni K, Dos Santos Toledo R, De Freitas Silva Filho M, Haydu VB, Pacheco RC, Labruna MB, et al. Survey of rickettsiae in humans, dogs, horses, and ticks in Northern Paraná, Brazil. *Semin Agrar* 2011;32:1527–38. doi:10.5433/1679-0359.2011v32n4p1527.

- [69] Lopes MG. Infecção por *Rickettsia* spp. em equídeos e carrapatos do Centro-Norte do Piauí. Universidade de São Paulo, 2012.
- [70] Andersson E. Seroprevalence of *Rickettsia rickettsii* and *Rickettsia amblyommii* in horses in three municipalities in the state of Pará, Brazil. Institutionen för kliniska vetenskaper, 2013.
- [71] Medeiros AP, Moura AB, Souza AP, Bellato V, Sartor AA, Vieira-Neto A, et al. Antibodies against rickettsiae from spotted fever groups in horses from two mesoregions in the state of Santa Catarina, Brazil. *Anticorpos contra rickettsias do grupo da febre maculosa em equinos de duas mesorregiões de Santa Catarina, Brasil*. *Arq Bras Med Vet Zootec* 2013;65:1713–9. doi:10.1590/S0102-09352013000600019.
- [72] Costa N, de Lemos ERS, Rozental T, Câmara R, Dias M, Silva R, et al. *Rickettsiae* of the Spotted Fever group in dogs, horses and ticks: an epidemiological study in an endemic region of the State of Rio de Janeiro, Brazil. *Rev Bras Parasitol Veterinária* 2014;36:294–300.
- [73] Cordeiro MD, de Almeida Raia V, de Almeida Valim JR, de Santana Castro GN, de Souza CE, da Fonseca AH. Frequência de anticorpos da classe IgG anti-*Rickettsia rickettsii* em equinos na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Campus Seropédica. *Brazilian J Vet Med* 2015;37:78–82.
- [74] Poubel I, Costa N, Borges E, Pereira NR, Pinheiro V. Circulation of spotted fever group rickettsia in dogs and horses in northwest of Rio de Janeiro state. 42^o Congr. Bras. Med. Veterinária e 1^o Congr. Sul-Brasileiro da ANCLIVEP, 2015, p. 1850–3.
- [75] Silveira I, Martins TF, Olegário MM, Peterka C, Guedes E, Ferreira F, et al. Rickettsial infection in animals, humans and ticks in Paulicéia, Brazil. *Zoonoses Public Health* 2015;62:525–33.
- [76] Moraes-Filho J, Horta MC, Pacheco RDC, Maeda MM, Galano A, Oliveira ML de, et al. Pesquisa de anticorpos anti-*Rickettsia rickettsii* em equinos do Centro de Controle de Zoonoses do município de São Paulo (CCZ/SP). *Brazilian J Vet Res Anim Sci* 2016;46:85. doi:10.11606/issn.1678-4456.bjvras.2009.26753.
- [77] Souza CE, Camargo LB, Pinter A, Donalisio MR. High seroprevalence for *Rickettsia rickettsii* in equines suggests risk of human infection in silent areas for the Brazilian spotted fever. *PLoS One* 2016;11:11–9. doi:10.1371/journal.pone.0153303.

- [78] Amorim EF, Costa FB, Moraes-Filho J, Santos ACG dos, Vale TL do, Costa AP da, et al. Exposure of Baixadeiro horses to *Rickettsia* spp. and to ticks infected by *Rickettsia amblyommatis* in the Baixada Maranhense micro-region, Maranhão, Brazil. *Ciência Rural* 2018;48.
- [79] de Toledo F, Acosta ICL, Martins TF, Moraes-Filho J, Krawczak F, Barbieri ARM, et al. Tick-borne infections in dogs and horses in the state of Espírito Santo, Southeast Brazil. *Vet Parasitol* 2018;249:43–8.
- [80] de Oliveira PB, Harvey T V, Fehlberg HF, Rocha JM, Martins TF, da Acosta ICL, et al. Serologic and molecular survey of *Rickettsia* spp. in dogs, horses and ticks from the Atlantic rainforest of the state of Bahia, Brazil. *Exp Appl Acarol* 2019:1–12.
- [81] Riveros-Pinilla DA, Acevedo G L, Londoño AF, Góngora A. Antibodies against spotted fever group *Rickettsia* sp ., in horses of the colombian Orinoquia. *RevMVZ Córdoba* 2015;20:5004–13.
- [82] Faccini-Martínez ÁA, A. R-H, Barreto C, Forero-Becerra E, Millán D, Valbuena E, et al. Epidemiology of spotted fever group rickettsioses and acute undifferentiated Febrile Illness in Villeta, Colombia. *Am J Trop Med Hyg* 2017;97:782-788. doi:10.4269/ajtmh.16-0442.
- [83] Lizarazo D, Valbuena G, Hidalgo M, Vesga JF. A Survey of Antibodies against *Rickettsia rickettsii* and *Ehrlichia chafeensis* in Domestic Animals from a Rural Area of Colombia. *Am J Trop Med Hyg* 2018;80:1029–30. doi:10.4269/ajtmh.2009.80.1029.
- [84] Londoño AF, Acevedo-Gutiérrez LY, Marín D, Contreras V, Díaz FJ, Valbuena G, et al. Wild and domestic animals likely involved in rickettsial endemic zones of Northwestern Colombia. *Ticks Tick Borne Dis* 2017;8:887–94. doi:10.1016/j.ttbdis.2017.07.007.
- [85] Quintero JC, Paternina LE, Uribe A, Muskus C, Hidalgo M, Gil J, et al. Eco-epidemiological analysis of rickettsial seropositivity in rural areas of Colombia: A multilevel approach. *PLoS Negl Trop Dis* 2017;11:19. doi:10.1371/journal.pntd.0005892.
- [86] Villalba MA. Estudio de seroprevalencia de rickettsiosis en animales y humanos y detección molecular de especies de *Rickettsia* en garrapatas recolectadas de animales domésticos de zonas priorizadas rurales del municipio del Tambo, Cauca.

Pontificia Universidad Javeriana, 2018.

- [87] Bermúdez CSE, Zaldívar a Y, Spolidorio MG, Moraes-Filho J, Miranda RJ, Caballero CM, et al. Rickettsial infection in domestic mammals and their ectoparasites in El Valle de Antón, Coclé, Panamá. *Vet Parasitol* 2011;177:134–8.
- [88] Bennett JE, Dolin R, Blaser MJ. Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases. Elsevier Health Sciences.; 2009.
- [89] Walker DH, Paddock CD, Dumler JS. Emerging and Re-emerging Tick-Transmitted Rickettsial and Ehrlichial Infections. *Med Clin North Am* 2008;92:1345–61. doi:10.1016/j.mcna.2008.06.002.
- [90] Tappe J, Strube C. *Anaplasma phagocytophilum* and *Rickettsia* spp. infections in hard ticks (*Ixodes ricinus*) in the city of Hanover (Germany): Revisited. *Ticks Tick Borne Dis* 2013;4:432–8. doi:10.1016/j.ttbdis.2013.04.009.
- [91] Lewis SR, Zimmerman K, Dascanio JJ, Pleasant RS, Witonsky SG. Equine Granulocytic Anaplasmosis: A Case Report and Review. *J Equine Vet Sci* 2009;29:160–6. doi:10.1016/j.jevs.2009.01.002.
- [92] Woldehiwet Z. The natural history of *Anaplasma phagocytophilum*. *Vet Parasitol* 2010;167:108–22. doi:10.1016/j.vetpar.2009.09.013.
- [93] Teglas M, Matern E, Lein S, Foley P, Mahan SM, Foley J. Ticks and tick-borne disease in Guatemalan cattle and horses. *Vet Parasitol* 2005;131:119–27. doi:10.1016/j.vetpar.2005.04.033.
- [94] De La Fuente J, Massung RF, Wong SJ, Chu FK, Lutz H, Meli M, et al. Sequence analysis of the *msp4* gene of *Anaplasma phagocytophilum* strains. *J Clin Microbiol* 2005;43:1309–17.
- [95] Uehlinger FD, Clancey NP, Lofstedt J. Granulocytic anaplasmosis in a horse from Nova Scotia caused by infection with *Anaplasma phagocytophilum*. *Can Vet J* 2011;52:537.
- [96] Santos HA, Thomé SMG, Baldani CD, Silva CB, Peixoto MP, Pires MS, et al. Molecular epidemiology of the emerging zoonosis agent *Anaplasma phagocytophilum* (Foggie, 1949) in dogs and ixodid ticks in Brazil. *Parasit Vectors* 2013;6:348. doi:10.1186/1756-3305-6-348.
- [97] Santos HA, Pires MS, Vilela JAR, Santos TM, Faccini JLH, Baldani CD, et al.

- Detection of *Anaplasma phagocytophilum* in Brazilian dogs by real-time polymerase chain reaction. *J Vet Diagnostic Investig* 2011;23:770–4.
- [98] Máttar S, Parra M. Detection of antibodies to *Anaplasma*, *Bartonella* and *Coxiella* in rural inhabitants of the Caribbean area of Colombia. *Rev MVZ Córdoba* 2006;11:781–9.
- [99] Passamonti F, Fabrizia V, Katia C, Stefano C, Giacomo C, Luisa MM, et al. *Anaplasma phagocytophilum* in horses and ticks: A preliminary survey of Central Italy. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 2010;33:73–83. doi:10.1016/j.cimid.2008.08.002.
- [100] Ismail N, McBride JW. Tick-Borne Emerging Infections. *Clin Lab Med* 2017;37:317–40. doi:10.1016/j.cll.2017.01.006.
- [101] Vargas-Hernández G, André MR, Faria JLM, Munhoz TD, Hernandez-Rodriguez M, Machado RZ, et al. Molecular and serological detection of *Ehrlichia canis* and *Babesia vogeli* in dogs in Colombia. *Vet Parasitol* 2012;186:254–60. doi:10.1016/j.vetpar.2011.11.011.
- [102] Melo ALT, Martins TF, Horta MC, Moraes-Filho J, Pacheco RC, Labruna MB, et al. Seroprevalence and risk factors to *Ehrlichia* spp. and *Rickettsia* spp. in dogs from the Pantanal Region of Mato Grosso State, Brazil. *Ticks Tick Borne Dis* 2011;2:213–8. doi:10.1016/j.ttbdis.2011.09.007.
- [103] Aguiar DM, Hagiwara MK, Labruna MB. In vitro isolation and molecular characterization of an *Ehrlichia canis* strain from São Paulo, Brazil. *Brazilian J Microbiol* 2008;39:489–93.
- [104] Cruz AC, Zwegarth E, Ribeiro MFB, da Silveira JAG, de la Fuente J, Grubhoffer L, et al. New species of *Ehrlichia* isolated from *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* shows an ortholog of the *E. canis* major immunogenic glycoprotein gp36 with a new sequence of tandem repeats. *Parasit Vectors* 2012;5:291.
- [105] Carmichael R, Duell J, Holbrook T, Herrin B, Leutenegger C, O'Connor T, et al. Antibodies Reactive to *Ehrlichia* spp. Are Common in Oklahoma Horses. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2014;14:552–6. doi:10.1089/vbz.2013.1570.
- [106] Vieira RF, Vieira TSWJ, Nascimento D do AG, Martins TF, Krawczak FS, Labruna MB, et al. Serological survey of *Ehrlichia* species in dogs, horses and humans:

- zoonotic scenery in a rural settlement from southern Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 2013;55:335–40. doi:10.1590/s0036-46652013000500007.
- [107] Vieira TS, Vieira RF, Krawczak FS, Soares HS, Guimarães AM, Barros-Filho IR, et al. Ehrlichia sp. infection in carthorses of low-income owners, Southern Brazil. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 2016;48:1–5. doi:10.1016/j.cimid.2016.07.002.
- [108] O’Nion V, Montilla HJ, Qurollo BA, Maggi RG, Hegarty BC, Tornquist SJ, et al. Potentially novel Ehrlichia species in horses, Nicaragua. *Emerg Infect Dis* 2015;21:335–8. doi:10.3201/eid2102.140290.
- [109] Vieira TSWJ, Qurollo BA, Mongrue ACB, Baggio RA, Vidotto O, Breitschwerdt EB, et al. Potentially same novel Ehrlichia species in horses in Nicaragua and Brazil. *Emerg Infect Dis* 2018. doi:10.3201/eid2405.172076.
- [110] Johnson AL. Update on infectious diseases affecting the equine nervous system. *Vet Clin North Am - Equine Pract* 2011;27:573–87. doi:10.1016/j.cveq.2011.08.008.
- [111] Zuluaga A, Botero F, Herrera WL, Robledo J, Cortés A, Lotero MC. Enfermedad de Lyme: Un caso comprobado en Colombia. *CES Med* 2000;14:44–50.
- [112] Stanchi NO, Balague LJ. Lyme disease: antibodies against Borrelia burgdorferi in farm workers in Argentina. *Rev Saude Publica* 1993;27:305–7.
- [113] Ciceroni L, Bartoloni A, Guglielmetti P, Paradisi F, Gamboa H, Roselli M. Prevalencia de anticuerpos contra Borrelia burgdorferi, Borrelia parkeri y Borrelia turicatae en poblados de la provincia cordillera, Bolivia. *J Trop Med Hyg* 1994;97:43–7.
- [114] Glenny M, Mendoza L, Falconí E. Detección de anticuerpos contra Borrelia burgdorferi e identificación de garrapatas ixodidas en Piura y Amazonas, Perú. *Rev Peru Med Exp Salud Publica* 2004;20:23–7.
- [115] Gouveia EA, Alves MF, Mantovani E, Oyafuso LK, Bonoldi VLN, Yoshinari NH. Profile of patients with Baggio-Yoshinari Syndrome admitted at “Instituto de Infectologia Emilio Ribas.” *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 2011;52:297–303. doi:10.1590/s0036-46652010000600003.
- [116] Mattar S, Lopez G. Searching for Lyme disease in Colombia: a preliminary study on the vector. *J Med Entomol* 1998;35:324–6.
- [117] Pacheco RC, Echaide IE, Alves RN, Beletti ME, Nava S, Labruna MB. Coxiella

burnetii in ticks, Argentina. *Emerg Infect Dis* 2013;19:344.

- [118] Marenzoni ML, Stefanetti V, Papa P, Casagrande Proietti P, Bietta A, Coletti M, et al. Is the horse a reservoir or an indicator of *Coxiella burnetii* infection? Systematic review and biomolecular investigation. *Vet Microbiol* 2013;167:662–9. doi:10.1016/j.vetmic.2013.09.027.
- [119] Agerholm JS. *Coxiella burnetii* associated reproductive disorders in domestic animals--a critical review. *Acta Vet Scand* 2013;55:13. doi:10.1186/1751-0147-55-13.

Capítulo 2.

Evidencia serológica en équidos de exposición a *Rickettsia* spp. y potenciales zonas de circulación de la bacteria en el noroeste de Colombia

Resumen

La rickettsiosis es considerada una zoonosis reemergente en Colombia cuya distribución espacial es poco conocida. Los equinos pueden considerarse como centinelas de la circulación de *Rickettsia* spp. en zonas de potencial transmisión humana. El objetivo de este estudio transversal fue determinar la proporción de seropositividad contra *Rickettsia* spp. en équidos del noroeste de Colombia, sus factores demográficos, ecológicos y potenciales áreas de riesgo en équidos, basados en el papel epidemiológico de los equinos como centinelas de zonas de transmisión. Para este fin se usó la técnica de inmunofluorescencia indirecta contra diversos antígenos de *Rickettsia* y un análisis de conglomerados en Sistemas de Información Geográfica. Se encontró un porcentaje de infección general del 53% (IC_{95%} 49,5-57,2) con valores más altos para antígenos de *Rickettsia bellii* y *Rickettsia rickettsii*, también para las especies de *R. amblyommatis*, *R. parkerii* y “*Candidatus R. colombianensi*”. Se reportaron títulos altos de anticuerpos que sugieren infecciones recientes y se evidenció reacciones homologas en 125 animales. Los modelos revelaron como factores y marcadores de riesgo a las variables especies de équido, edad, infestación por garrapatas y clima del sitio de procedencia. Se identificaron zonas probables de riesgo de forma diferencial para cada antígeno. Los resultados indican una amplia circulación de especies de *Rickettsia* en el noroeste del país, lo cual sugiere que esta zona es de posible riesgo de exposición para sus habitantes.

Palabras claves

Centinelas, inmunofluorescencia indirecta, zonas de riesgo, fiebre manchada

Introducción

Rickettsia es un género de bacterias Gram negativas transmitidas por artrópodos que tienen forma cocobacilar de 0,3 a 1 μm y se clasifican en el filo Proteobacterias, clase Alfabroteobacteria, orden Rickettsiales y familia Rickettsiaceae [1]. Son bacterias intracelulares obligadas que parasitan células eucariotas y que tiene como principal célula blanco, en los hospedadores vertebrados, el endotelio vascular [2].

Según características antigénicas y moleculares, las especies de *Rickettsia* se agrupan en cuatro categorías: el grupo tifo (GT) conformado por *Rickettsia prowazekii* y *Rickettsia typhi*; el grupo ancestral (GA) el cual incluye a *Rickettsia bellii* y *Rickettsia canadensis*; el grupo transicional (GT) que incluye por *Rickettsia akari*, *Rickettsia australis* y *Rickettsia felis*; y el grupo de las fiebres manchadas (GFM) constituido por más de 20 especies, incluyendo los patógenos transmitidos por garrapatas, *Rickettsia rickettsii* y *Rickettsia conorii* [3,4].

Varios agentes de GFM transmitidos por garrapatas se han descrito como agentes de enfermedades humanas en las Américas. Entre estos, *R. rickettsii* que es la especie más virulenta del GFM y es el agente etiológico de la Fiebre Manchada de las Montañas Rocosas (FMMR), que también ha recibido como denominación Fiebre de Tobia en Colombia y Fiebre moteada Brasileira en Brasil [4]. Esta enfermedad a su vez es considerada una zoonosis importante en salud pública, presentando tasas y porcentajes de letalidad menores al 0.5% en países como Estados Unidos y hasta de 54% en Colombia [5,6]. Esta bacteria tiene distribución a través del continente americano en varios países, tales como Canadá, Estados Unidos, México, Costa Rica, Panamá, Colombia, Brasil y Argentina, donde es transmitida a diferentes hospederos por las garrapatas *Dermacentor variabilis* y *Dermacentor andersoni* en Norteamérica, *Rhipicephalus sanguineus* s.l. en el sur de Estados Unidos y México, especies del complejo *Amblyomma cajennense* en Centro y Suramérica, y *Amblyomma aureolatum* en Brasil [7].

En la región neotropical los équidos son comúnmente infestados por garrapatas, entre las cuales se encuentra especies del complejo *A. cajennense* (llamado en adelante *A. cajennense* sensu lato (s.l.), *Dermacentor nitens* y en menor grado *Rhipicephalus microplus*, las cuales se han encontrado infectadas con especies de *Rickettsia* [8,9]. Ante esta situación los équidos (especialmente los *E. caballus*) pueden llegar a ser expuestos con *R. rickettsii* y con otras especies de *Rickettsia*, como lo evidencian estudios serológicos, donde se han hallado seropositividades para agentes del GFM entre el 8% y 77% en Brasil [10–12], del 70% en Panamá, y del 16.3% al 46% en Colombia [13–15].

Esta respuesta serológica medible, aunada al hecho de que los équidos son parasitados por múltiples especies de garrapatas que pueden ser potenciales vectores de *Rickettsia*, los hace potenciales centinelas de la circulación de *Rickettsia* [16]. Vale aclarar que, aunque los equinos son seropositivos a *Rickettsia* spp. bajo condiciones naturales, la

infección experimental en *E. caballus* con *R. rickettsii* inducen seroconversión sin alteración clínica o rickettsemia [17].

En Colombia la rickettsiosis es una enfermedad reemergente, desatendida, y sin reporte obligatorio, cuyos casos más recientes se han presentado en forma de brotes o casos aislados, en zonas como el Urabá antioqueño, en el corregimiento de los Córdoba (Córdoba), y en Villeta (Cundinamarca), pero se sospecha que su distribución es más amplia. Considerado lo anterior, a que existe un tratamiento efectivo con doxiciclina, la que limita las secuelas y potenciales muertes pero que requiere identificar las zonas de circulación de la bacteria, y a la utilidad de los equinos como centinelas, nos propusimos determinar la proporción de seropositividad contra *Rickettsia* spp. en équidos del noroeste de Colombia, sus factores demográficos, ecológicos y potenciales áreas de riesgo, teniendo como hipótesis que la seropositividad en los équidos está relacionada con factores demográficos y ecológicos de los animales.

Metodología

Tipo y sitio de estudio

Se realizó un estudio analítico transversal en la planta de beneficio de équidos La Rinconada, ubicada en el municipio de Rionegro, Antioquia la cual recibe animales de los departamentos de Antioquia y la Costa Caribe. El muestreo se realizó durante junio de 2015 a junio 2016.

Cálculo de la muestra

Se realizó un muestreo por conveniencia con una muestra esperada de 497 animales, la cual fue calculada considerando una población establecida de 26.000 équidos procesados en la Planta en un año, un nivel de confianza del 95%, un error por efecto del diseño del 1.2%, un error muestral de 4,6%, una frecuencia esperada de 46% y un 10% adicional por pérdidas (EPIDAT 4.0) [14]. El muestreo fue ejecutado durante un año con un muestreo de 12 animales en promedio por semana.

Criterios de inclusión

Se incluyeron équidos que tuvieran guía de movilización del Instituto Colombiano Agropecuario (ICA).

Criterios de exclusión

Se excluyeron animales en malas condiciones de salud según criterios clínicos de los médicos veterinarios, que fueran salvajes, que representarán algún peligro para las

personas que recolectaran las muestras, que no contaran con guía de movilización o que estuvieran próximos al proceso de faenado.

Recolección de las muestras

A cada animal se le realizó una punción de la vena yugular para obtener sangre y las muestras se sometieron a centrifugación, 2500 g por 10 minutos, para la separación del suero.

A los équidos se les determinó los datos de especie, edad siguiendo claves dentales [18], sexo, puntaje de condición corporal [19], presencia de infestación por garrapatas, especies de garrapatas clasificadas por claves dicotómicas [20], municipio y departamento probable de origen (según la guía de movilización de animales ICA). Los datos de las variables ecológicas por municipio se obtuvieron a partir de la capa climática de Lang 2012 del Sistema de Información Ambiental de Colombia SIAC (<http://www.siac.gov.co/catalogo-de-mapas>) y de la capa de ecoregiones terrestres de World Wild Fund for Nature [21].

Dada la dinámica de transporte de los animales a la planta, sólo fue posible considerar el sitio de origen como probable, dado que en algunas ocasiones los transportadores recogían animales en la vía de traslado, lo cual, según lo relatado por ellos, nos da para considerar una incertidumbre entre el 0-15% del origen en los lotes del animal. Este sesgo se trató de controlar muestreando días específicos de llegada de los transportistas para confirmar los datos de origen con ellos.

Pruebas serológicas

Las muestras de suero fueron probadas por inmunofluorescencia indirecta (IFI) usando placas antigenadas con diferentes especies de *Rickettsia* siguiendo a Horta et al. (2004) y Ueno et al. (2016), producidas en el Laboratorio del Doctor Marcelo Labruna (Universidad de Sao Paulo) en cultivos de celular Vero infectadas y mantenidas con medio RPMI 1640 (Gibco®) suplementado con suero de ternero (HyClone™) al 10% y disponiendo 10 µl de células infectadas en láminas de 12 pozos [1, 12,17]. Los antígenos utilizados para cada suero (dado que los animales podían haber tenido contacto con varias especies de *Rickettsia*) fueron *R. rickettsii* cepa Tiaçu, *R. parkeri* cepa At24, *R. amblyommatis* cepa Ac37, *R. bellii* cepa CL y “*Candidatus Rickettsia colombianensi*” cepa Brasil. A las muestras positivas (título ≥ 64) se les determinó el punto final en diluciones seriadas dobles, utilizando en las láminas 10µl de la dilución de suero e incubando 30 minutos.

Como anticuerpo secundario se usó un IgG anti-caballo comercial marcado con FITC (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU.). Las muestras de suero se probaron inicialmente a la dilución 1:64. A las muestras positivas en el tamizaje inicial se les realizó la determinación de los títulos finales. La prueba se usó según valoraciones previas estandarizadas en el laboratorio. Se utilizaron sueros de *E. caballus* del estudio de Ueno et al. (2016), como controles positivo y negativo, los cuales se agregaron a cada lamina de IFI. Los sueros que mostraron un título de anticuerpos para una especie de *Rickettsia* al menos cuatro veces mayor que los títulos observados para las otras especies, se consideraron que presentaban una reacción homóloga a la primera especie de *Rickettsia* o a un genotipo muy relacionado, como fue descrito previamente como los Antígenos Probables Involucrados en Reacción Homóloga (APIRH) [12,17].

Análisis estadístico

Todas las variables se establecieron en categorías y se les realizó un análisis descriptivo utilizando frecuencias absolutas y relativas, un análisis bivariado de la infección en los équidos por prueba Chi-cuadrado. El desenlace o variable dependiente fue definida como équido con presencia (título ≥ 64) o ausencia (título < 64) de anticuerpos contra *Rickettsia* por la prueba de IFI. Los títulos finales de las muestras para las diferentes especies de *Rickettsia* se describieron a través del cálculo de la media geometría y el gráfico de cajas y bigotes. Las variables con un valor p menor o igual a 0.25 (criterio de Hosmer y Lemeshow) se incluyeron en el análisis multivariado, que consistió en una regresión log-log complementaria multinivel y se consideró el municipio probable de origen como componente aleatorio. Se consideraron variables a nivel individual como especie, edad por cuartiles, sexo, lugar de origen, puntaje de condición corporal, infestación por garrapatas, y a nivel ecológico (clima y ecorregión). Se usó el método de selección paso a paso según el criterio de los investigadores. Se calculó la razón de proporción (RP) cruda y ajustada [22]. Los análisis se realizaron con los paquetes estadísticos SPSS v21 y Stata v15.0

Análisis por sistemas de información geográfica

Con el fin de explorar la presencia de conglomerados de casos seropositivos en el noroeste Colombia y así identificar potenciales zonas de muestreo posterior, se realizó un análisis espacial en el programa SatScan 9.6 (www.satscan.org, 2018) [23], basada en un modelo Poisson para detectar conglomerados espaciales significantes ($p < 0.05$), partiendo de la hipótesis nula de que no hay mayor proporción de casos en los conglomerados que

fuera de ellos. El programa además indica el riesgo relativo de cada conglomerado respecto a los demás sitios de estudio. El análisis se realizó a las muestras a las cuales se logró definir APIRH a través de la diferencia cuádruple entre los títulos de los anticuerpos con las diferentes especies y ajustando los datos poblacionales de équidos por los datos municipales del censo del ICA para el año 2016 (<https://www.ica.gov.co/Areas/Pecuaria/Servicios/Epidemiologia-Veterinaria/Censos-2016/Censo-2016/Équidos-por-Muni-y-Dpto-2016.aspx>). Los datos de los conglomerados se ubicaron espacialmente en el software Qgis 3.0.1.

Consideraciones éticas

El proyecto cumple con las directrices del Comité de Ética en Experimentación Animal de la Universidad de Antioquia, según consta en el acta 72 de 2014.

Resultados

Generales

El proceso de muestreo fue realizado durante un año con un total de 48 salidas de campo y 649 animales muestreados. Estas muestras fueron representadas por 54% de *E. caballus*, un 41% de *E. asinus* y un 5% de *E. asinus x E. caballus*. Del total de los animales muestreados un 50% eran hembras y 50% machos, con una edad promedio de 11 años (rango 0.2-30 años). Un total de 19% fueron animales jóvenes (≤ 5 años), un 63% fueron adultos (5 y 18 años) y 19% fueron mayores (> 18 años). Los animales provenían de seis probables departamentos, que de mayor a menor porcentaje fueron Córdoba (60%), Antioquia (24%), Sucre (8.6%), Bolívar (5.4%), Magdalena (3.4%) y Atlántico (1.5%). Se obtuvieron muestra de 28 municipios probables, los cuales según el departamento de origen fueron: Antioquia (Anzá, Arboletes, Cáceres, Caucasia, Mutatá, Puerto Berrio, San Carlos, Tarazá, Turbo y Urrao), Córdoba (Canalete, Cereté, Loricá, Montería, Planeta Rica, Sahagún, San Carlos y Valencia), Sucre (Majagual, Ovejas, Sincelejo, Tolú y Toluviejo), Bolívar (Clemencia, Morales y Turbaco), Atlántico (Barranquilla) y Magdalena (Tenerife).

Un 59% de los équidos se encontraron infestados con garrapatas de las especies *D. nitens* (n=307), *A. cajennense* s.l. (n=133), *Rh. microplus* (n=58) y *A. ovale* (n=1), esta última garrapata fue encontrada en un *E. asinus* proveniente del municipio de Tarazá (Antioquia). Se encontró una diferencia entre la infestación y la especie de équido, debido a que los *E. asinus* se encontraron con menor grado de infestación que los *E. caballus* y que *E. asinus x E. caballus* (Figura 2-1)

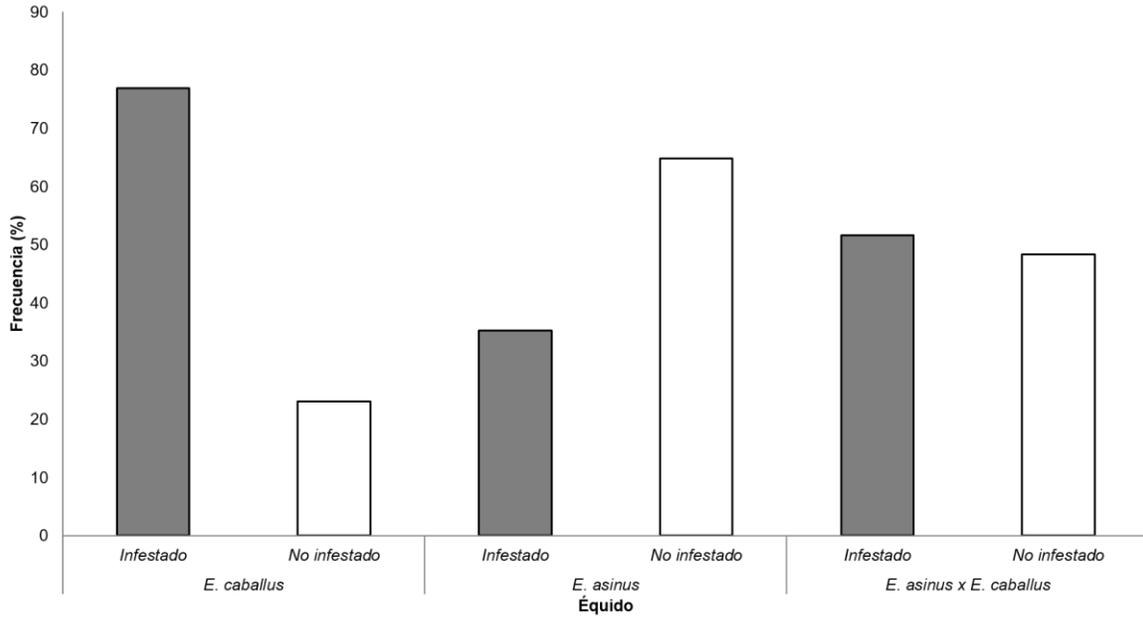


Figura 2-1. Frecuencia de infestación por garrapatas según especie de équido.

Serológicos

Se obtuvo un porcentaje de positividad general del 53% (IC_{95%} 49.5-57.2), considerando positividad aquella reacción para por lo menos un antígeno en la IFI. Discriminando por cada uno de los antígenos se encontró una seropositividad del 27% (172/649) para *R. amblyommatis* con media geométrica (MG) de 182, del 38% (247/649) para *R. bellii* con una MG de 188, del 22% (146/649) para “*Candidatus Rickettsia colombianensi*” con MG de 128, del 35% (227/649) para *R. rickettsii* MG de 231.5, y del 18% (120/649) para *R. parkeri* con MG de 134. Los títulos finales más altos de las muestras fueron observados para *R. rickettsii* y *R. bellii* con valores hasta 8192, seguido de *R. amblyommatis* hasta 4096, *R. parkeri* hasta 2048 y “*Candidatus R. colombianensi*” hasta 1024 (Figura 2-2).

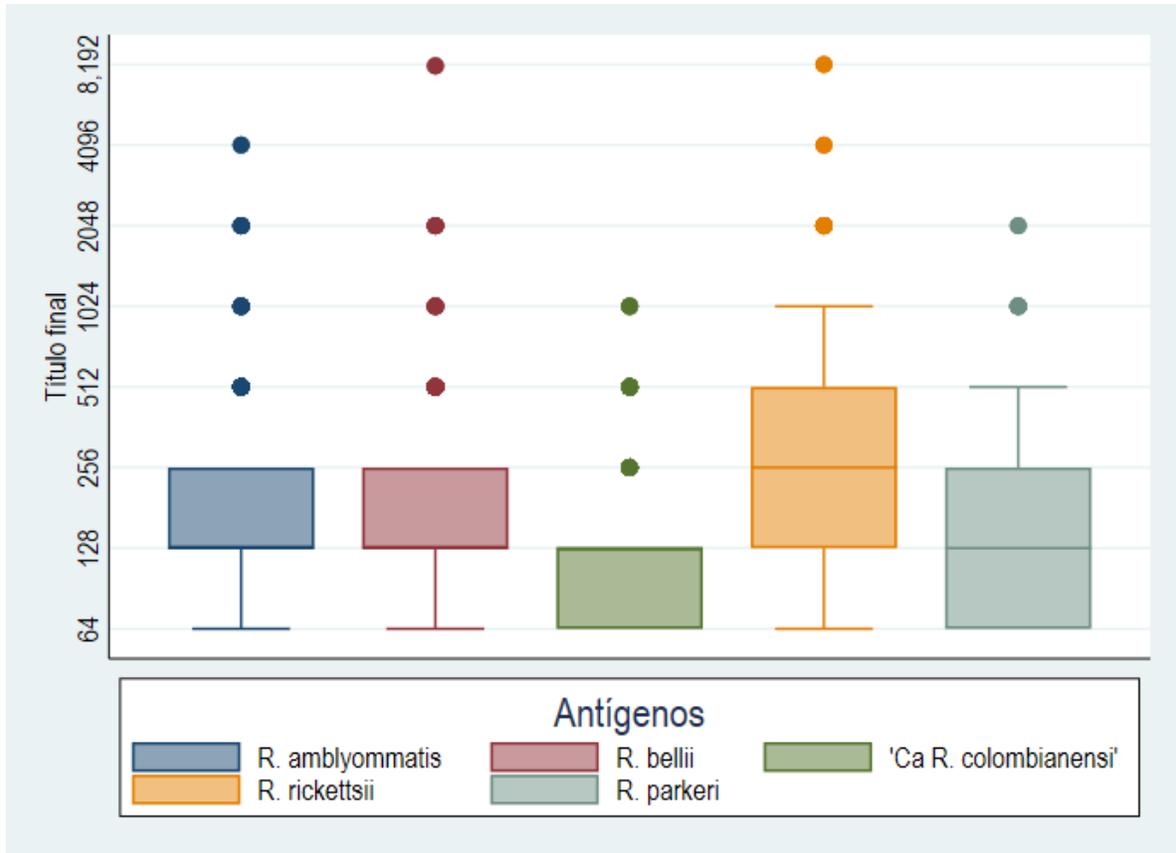


Figura 2-2. Gráfico de cajas y bigotes que describe la dispersión de los títulos de anticuerpos por cada especie de *Rickettsia* analizada. Se realizó transformación logarítmica del eje y.

Teniendo en cuenta la diferencia cuádruple entre los títulos de los anticuerpos, se determinaron los APIRH en 125 muestras, de las cuales 72 correspondían a *R. bellii*, 30 a *R. rickettsii*, 11 a *R. amblyommatis*, 9 a "*Candidatus R. colombianensi*" y 2 a *R. parkeri*. El análisis según los municipios probables de origen indica una seropositividad en todos los municipios con unos valores que varían entre 10 al 80% (Tabla 2-1).

Tabla 2-1. Distribución de la seropositividad por municipio probable de origen, antígeno y APIRH

Departamento	Municipio	n/N (%)	<i>R. bellii</i>	<i>R. rickettsii</i>	<i>R. amblyommatis</i>	"Ca R. colombianensi"	<i>R. parkeri</i>	APIRH
			n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	
Antioquia	Anzá	9/12 (75)	7(58)	4(33)	5(42)	-	4(33)	4 (1 <i>R. rickettsii</i> , 3 <i>R. bellii</i>)
	Arboletes	10/15 (67)	7(47)	4(27)	6(40)	4(27)	1(7)	5 (2 <i>R. amblyommatis</i> , 3 <i>R. bellii</i>)
	Cáceres	11/15 (73)	6(40)	9(60)	3(20)	8(53)	4(27)	4 (2 <i>R. rickettsii</i> , 2 <i>R. bellii</i>)
	Caucasia	7/18 (39)	5(28)	4(22)	3(17)	2(11)	2(11)	2 (1 <i>R. bellii</i> , 1 "Ca R. colombianensi")
	Mutató	4/5 (80)	2(40)	3(60)	3(60)	2(40)	2(40)	1 (1 <i>R. amblyommatis</i>)
	Puerto Berrio	2/7 (29)	1(14)	1(14)	-	-	-	2 (1 <i>R. rickettsii</i> , 1 <i>R. bellii</i>)
	San Carlos	5/12 (42)	2(17)	2(17)	1(8)	2(17)	-	1 (1 <i>R. rickettsii</i>)
	Tarazá	6/9 (67)	4(44)	4(44)	3(33)	3(33)	2(22)	4 (2 <i>R. rickettsii</i> , 2 <i>R. bellii</i>)
	Turbo	32/57 (56)	19(33)	21(37)	16(28)	13(23)	14(25)	9 (4 <i>R. rickettsii</i> , 1 <i>R. amblyommatis</i> , 3 <i>R. bellii</i> , 1 <i>R. parkeri</i>)
	Urao	4/7 (57)	4(57)	1(14)	2(29)	2(29)	1(14)	3 (2 <i>R. bellii</i> , 1 "Ca R. colombianensi")
Atlántico	Barranquilla	1/10 (10)	-	1(10)	-	-	-	1 (1 <i>R. rickettsii</i>)
Bolívar	Clemencia	4/13 (31)	4(31)	2(15)	1(8)	1(8)	1(8)	1 (1 <i>R. bellii</i>)
	Morales	5/12 (42)	3(25)	4(33)	1(8)	4(33)	1(8)	-
	Turbaco	4/10 (40)	2(20)	3(30)	3(30)	2(20)	3(30)	-
Córdoba	Canalete	16/40 (40)	12(30)	14(35)	11(28)	10(25)	4(10)	4 (2 <i>R. rickettsii</i> , 2 "Ca R. colombianensi")
	Cereté	10/14 (71)	7(50)	8(57)	7(50)	4(29)	3(21)	4 (2 <i>R. rickettsii</i> , 1 <i>R. amblyommatis</i> , 1 <i>R. bellii</i>)
	Lórica	15/21 (71)	12(57)	10(48)	10(48)	9(43)	8(38)	3 (3 <i>R. bellii</i>)
	Majagual	5/7 (71)	2(29)	3(43)	1(14)	2(29)	2(29)	1 (1 <i>R. parkeri</i>)
	Montería	109/209 (52)	82(39)	69(33)	57(27)	41(20)	38(18)	47 (8 <i>R. rickettsii</i> , 5 <i>R. amblyommatis</i> , 33 <i>R. bellii</i> , 1 "Ca R. colombianensi")
	Planeta Rica	20/32 (63)	13(41)	13(41)	3(9)	7(22)	2(6)	11 (2 <i>R. rickettsii</i> , 6 <i>R. bellii</i> , 3 "Ca R. colombianensi")
	Sahagún	16/23 (70)	15(65)	13(57)	7(30)	4(17)	6(26)	5 (5 <i>R. bellii</i>)
Magdalena	San Carlos C	12/20 (60)	8(40)	10(50)	9(45)	8(40)	5(25)	3 (3 <i>R. rickettsii</i>)
	Valencia	5/10 (50)	2(20)	4(40)	3(30)	5(50)	2(20)	1 (1 <i>R. amblyommatis</i>)
	Tenerife	6/22 (27)	3(14)	3(14)	3(14)	5(23)	3(14)	2 (1 <i>R. bellii</i> , 1 "Ca R. colombianensi")
	Ovejas	3/6 (50)	3(50)	1(17)	-	-	-	2 (2 <i>R. bellii</i>)
Sucre	Sincelejo	8/10 (80)	6(60)	5(50)	8(80)	4(40)	5(50)	1 (1 <i>R. rickettsii</i>)
	S. de Tolú	8/12 (67)	8(67)	6(50)	5(42)	-	4(33)	3 (1 <i>R. amblyommatis</i> , 2 <i>R. bellii</i>)
	Tolúviejo	9/21 (43)	8(38)	5(24)	1(5)	4(19)	3(14)	1 (1 <i>R. bellii</i>)
Total		346/649 (53)	247 (38)	227 (35)	172 (27)	146 (22)	120 (18)	125 (72 <i>R. bellii</i>, 30 <i>R. rickettsii</i>, 12 <i>R. amblyommatis</i>, 9 "Ca R. colombianensi", 2 <i>R. parkeri</i>)

Tabla 2-2. Descripción por departamento de las variables incluidas en el análisis multivariado y razón de prevalencia.

Variable	Antioquia (n=157) n(%)	Atlántico- Magdalena (n=32) n(%)	Bolívar (n=35) n(%)	Córdoba (n=369) n(%)	Sucre (n=56) n(%)	RP (IC95%) N=649 n(%)	valor p	
Especie de équido	<i>E. asinus</i>	55 (35)	30 (94)	23 (66)	136 (37)	23 (41)	Ref	<0.001
	<i>E. caballus</i>	92 (59)	1 (3)	7 (20)	221 (60)	30 (54)	2.25 (1.95-2.53)	
	<i>E. asinus</i> x <i>E. caballus</i>	10 (6)	1 (3)	5 (14)	12 (3)	3 (5.0)	1.87 (1.29-2.47)	
Edad cuartiles (años)	0-7	36 (23)	17 (53)	6 (17)	95 (26)	15 (27)	Ref	<0.001
	8-12	32 (20)	10 (31)	11 (31)	114 (31)	13 (23)	1.8 (1.41-2.21)	
	12-15	39 (25)	3 (9)	8 (23)	78 (21)	13 (23)	2.14 (1.71-2.55)	
	>15	49 (31)	2 (6)	10 (29)	80 (22)	15 (27)	2.14 (1.72-2.54)	
Infestación garrapatas	Ausente	62 (40)	25 (78)	20 (57)	140 (38)	22 (39)	Ref	<0.001
	Presente	95 (60)	7 (22)	15 (43)	229 (62)	34 (61)	1.5 (1.3-1.7)	
Infestación A. cajennense s.l.	Ausente	112 (71)	31 (97)	26 (74)	297 (80)	50 (89)	Ref	0.001
	Presente	45 (29)	1 (3.0)	9 (26)	72 (20)	6 (11)	1.3 (1.11-1.49)	
Infestación D. nitens	Ausente	86 (55)	26 (81)	26 (74)	182 (49)	22 (39)	Ref	<0.001
	Presente	71 (45)	6 (19)	9 (26)	187 (51)	34 (61)	1.33 (1.15-1.5)	
Clima	Árido	-	32 (100)	12 (34)	-	-	Ref	0.002
	Semi-árido	-	-	23 (66)	349 (95)	49 (88)	1.98 (1.29-2.75)	
	Semi-húmedo	116 (74)	-	-	20 (5.0)	7 (12)	2.08 (1.34-2.88)	
	Húmedo	27(0.17)	-	-	20 (5.4)	7 (12)	2.17 (1.26-3.13)	
	Superhúmedo	14(8.9)	-	-	-	-	2.62 (1.5-3.48)	
Ecoregión	Sistema montañoso tropical	16 (10)	-	-	-	-	Ref	0.11
	Bosque seco tropical	-	10 (31)	23 (66)	-	39 (70)	0.64 (0.31-1.08)	
	Bosque húmedo deciduo tropical	27 (17)	22 (69)	-	369 (100)	10 (18)	0.94 (0.84-1.42)	
	Bosque lluvioso tropical	114 (73)	-	12 (34)	-	7 (12)	0.85 (0.65-1.3)	

A los resultados serológicos se les realizó un análisis estadístico bivariado en el cual se encontraron diferencias estadísticas para algunas variables (Tabla 2-2). Al análisis multivariado ingresaron a nivel individual las variables infestación por garrapatas, especie y edad por cuartiles, y a nivel ecológico las variables anteriores más el clima (Tabla 2-3). El modelo mostró como factores de riesgo a las variables infestación y clima y como marcadores de riesgo, la especie del animal y la edad. Se indica mayor riesgo de seropositividad en los animales si eran *E. caballus* o *E. asinus* x *E. caballus* de edad mayor, infestados con garrapatas y de zonas climáticas húmedas. El valor *p* de la varianza del modelo nos indica que en cuanto a la seropositividad existe variación entre los municipios, evidenciando que puede haber diferencias sustanciales entre las regiones de estudio con relación al desenlace.

Tabla 2-3. Factores y marcadores de riesgo asociados con la seropositividad para *Rickettsia* en équidos. Regresión Log-log complementaria multinivel.

Variable	Modelo nulo		Modelo 1		Modelo 2	
	RP IC(95%)	valor <i>p</i>	RP IC(95%)	valor <i>p</i>	RP IC(95%)	valor <i>p</i>
Infestación por garrapatas			1.42 (1.16-1.71)	0.001	1.42 (1.15-1.74)	0.001
Especie de équido			1.26 (1.1-1.43)	0.001	1.28 (1.12-1.46)	<0.001
Edad cuartiles (años)			1.19 (1.09-1.31)	<0.001	1.19 (1.08-1.31)	<0.001
Clima					1.15 (1.01-1.3)	0.034
Varianza (error estándar)	0.74 (0.06)	0.002	0.02 (0.047)	<0.001	8.78x10-33(2.03x10-17)	<0.001
AIC	898.2062		832.3543		827.8384	
BIC	907.157		854.7083		832.3543	

Análisis espacial de los resultados serológicos

Cuando se hizo la exploración para el riesgo de seropositividad por el género *Rickettsia*, se identificaron cinco conglomerados, dos ubicados en los municipios de Córdoba, Sucre, Bolívar, y que se sobreponen en el suroeste de Córdoba. Para estos conglomerados se obtuvieron valores de riesgo indicado por la Razón de Prevalencia (RP) de 2.07 (IC_{95%} 1.39-3.08) y de 2.45 (IC_{95%} 1.94-3.1). El tercer y cuarto conglomerado se ubicaron en el departamento de Antioquia en la región del Bajo Cauca y en el sur con unos RP de 2.5 (IC_{95%} 1.04-6) y 3.61 (IC_{95%} 1.77-7.35), respectivamente. El último conglomerado se ubicó en el municipio de Antioquia con un RP de 2.47 (IC_{95%} 1.43-4.28) (Figura 2-3).

En este análisis se identificaron conglomerados con diferencia significativa para *R. amblyommatis* en la región del Urabá con un RP de 13.5 (IC_{95%} 1.56-116.8), y *R. bellii* en

el municipio de Montería RP de 4.1 (IC_{95%} 2.31-7.18). Para la seropositividad de *R. rickettsii*, de otro lado, fue detectada en gran parte del suroeste de la región estudiada que se extiende a la región pacífica con un RP de 3.3 (IC_{95%} 1.1-10.98) y en los centro-oeste de Córdoba y Sucre con un RP de 6.8 (IC_{95%} 1.39-33.34). Para el riesgo de seropositividad para "*Candidatus Rickettsia colombianensi*" y *R. parkeri* no hubo diferencia significativa por lo cual la proporción de positivos dentro de los conglomerados y fuera de estos, no fue diferente.

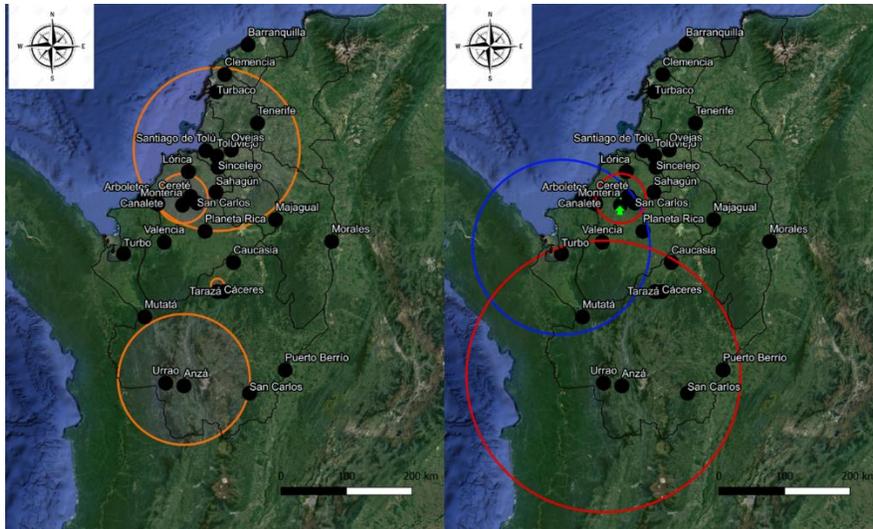


Figura 2-3. Conglomerados espaciales según la seropositividad en équidos para cada especie de *Rickettsia*. En azul se presentan los resultados para *R. amblyommatis*, en verde *R. belli* y en rojo *R. rickettsii*, según los hallazgos positivos por APIRH. En naranja se presentan los resultados para todas las especies de *Rickettsia*. Los municipios probables de origen se representan como círculo negro.

Discusión

En este estudio encontramos una seropositividad de los équidos del noroeste de Colombia contra *Rickettsia*. Investigaciones previas han vinculado principalmente los *E. caballus* como centinelas de la circulación de la bacteria, en estos resultados se identifica que otros équidos, como *E. asinus* y sus híbridos, también presentan evidencia serológica de exposición. En los estudios previos en équidos realizados en zonas endémicas en el país, *R. rickettsii* se ha utilizado como antígeno, resultando seropositividades que van desde 21% hasta 46% [14,24], lo cual nos puede sugerir de manera general que los municipios de estudio pueden ser considerados, en su mayoría, como probablemente endémicos para rickettsiosis, lo cual está en consonancia con resultados previamente publicados en Italia y Brasil, en los cuales se ha sugerido que sitios con frecuencias

superiores al 40% en animales, son indicativos de endemidad en humanos [10,25,26]. Aunque los datos de casos en humanos son restringidos a pocas localidades, se requiere para estudios posteriores ya que darían una idea más completa del escenario epidemiológico de esta dolencia en el noroeste del país [14,27].

Estos resultados sugieren una amplia circulación de *R. bellii* o una especie antigénicamente similar en la zona, lo cual corresponde a que es una bacteria comúnmente hallada en diferentes especies de garrapatas, por lo cual la probabilidad de contacto con ella aumenta [28]. El segundo lugar de *R. rickettsii* en seropositividad es llamativo debido, no solo, al impacto que su amplia distribución puede tener para la población humana y animal susceptible a la infección (por ejemplo, caninos), debido a que es la especie más virulenta del género, si no también, a que previamente en algunos municipios del área de estudio se han reportado casos letales y a que algunos casos se solapan con otros agentes causantes de síndromes febriles [29,]. De igual manera, los porcentajes de infección para las demás especies abren la posibilidad de que al igual que sucede con los équidos, los humanos de estas áreas pueden estar expuestos a múltiples especies de *Rickettsia*, que son incluso de patogenicidad desconocida. Esto soporta la propuesta de un abordaje de los estudios epidemiológicos con múltiples antígenos para tener un acercamiento más adecuado de la epidemiología en la región.

El hallazgo de diversas especies *Rickettsia* y de garrapatas en una región donde previamente se han reportado casos de rickettsiosis, pueden tener un impacto sobre la epidemiología de la enfermedad en la zona, dado que se ha propuesto que infecciones previas con especies de virulencia media o baja pueden generar protección cruzada frente a infecciones de especies con alta virulencia, funcionando como un proceso de inmunosupresión o inmunopotenciación, como se ha evidenciado en ensayos donde se han infectado con especies como *R. amblyommatis* y posterior reto con *R. rickettsia* [30].

Comparando los resultados de APIRH, nuestros datos, en los cuales se encontró mayoría de reacción homóloga para *R. bellii* y *R. rickettsii*, difieren a lo previamente reportado en Pantanal, Brasil donde se encontró mayor número para los antígenos de *R. parkeri* y *R. amblyommatis*, y lo reportado en Panamá en el cual se indicó un APIRH principalmente para *R. amblyommatis* [13,31]. Por el contrario, otro estudio en Brasil presentó parcial similitud a este reporte, al informar unos mayores valores para *R. rickettsii*, aunque no sucedió lo mismo para *R. bellii* [25]. Las diferencias con estos estudios pueden sugerir que en el noroeste de Colombia el escenario epidemiológico es diferente respecto a las

especies circulantes y sus vectores, aunque los hallazgos para *R. rickettsii* ha de tenerse especial atención ya que como sugiere Souza et al, (2017), las áreas con altas seroprevalencias en equinos pueden indicar riesgo para los humanos, aunque sean consideradas áreas silentes [25]. En el trabajo de Quintero et al, 2017 en el Urabá antioqueño, ubicado en el noroeste de Colombia, se encontraron como APIRH las especies de *R. amblyommatis* y *R. rickettsii*, siendo esta última la de mayor porcentaje, lo cual coincide con nuestros hallazgos y sugieren que esa especie u otra antigénicamente cercana se encuentra circulando en la región, no obstante se requeriría utilizar otras técnicas más complejas como la inmunoadsorción cruzada [1]. En este estudio del 2017 se utilizaron como antígenos las especies *R. rickettsii*, *R. amblyommatis* y *R. parkeri*, por lo cual no podemos comparar los resultados para *R. bellii* que tuvo el mayor valor en seropositividad [27].

Los títulos altos de anticuerpos encontrados (>1024) sugieren procesos de infección recientes que pudieron acontecer en semanas previas a la fecha del muestreo. estas consideraciones son derivadas de la cinética de los anticuerpos IgG durante una infección experimental realizada en *E. caballus* en Brasil, y asimismo refleja la circulación activa de diferentes especies de *Rickettsia* en la zona; no obstante, debe considerarse que los équidos incluidos en nuestro trabajo no contaban con la misma dieta, edad, estado inmunológico, entre otras características que pueden afectar la producción de anticuerpos y la respuesta inmunológica, que los animales del ensayo experimental en Brasil [17].

La identificación de algunas zonas de potencial circulación de la bacteria corresponde con la distribución de algunos casos de rickettsiosis en los municipios de Turbo, Necoclí y Los Córdoba, y con reportes previos de las especies informadas en algunos artículos científicos, tales como el conglomerado de *R. amblyommatis* que corresponde con reportes previos de esta *Rickettsia* en la región del Urabá, de igual manera ocurre para *R. rickettsii* y los reportes de brotes en la misma zona (Figura 2-3) [27,30].

Los modelos multivariados nos indican que los *E. caballus* tienen una mayor probabilidad de ser seropositivos respecto a los *E. asinus*, lo cual puede estar relacionado con que estos últimos presentan menores grados de infestación por garrapatas como previamente se ha reportado en Brasil y que se ha vinculado con la presencia de semioquímicos en los *E. asinus* que repelen su infestación por garrapatas [12,32,33]. Respecto a la edad podemos detectar que probablemente los porcentajes de infección natural en garrapata

son bajas como la han demostrado estudios en la zona del Urabá donde se encontró un 5% de infección en garrapatas, lo cual se refleja en que los animales necesitan mayor tiempo para exponerse a alguna de estas que esté infectada, y por esta razón los animales adultos y mayores tienen una mayor probabilidad de ser seropositivos [14].

Este modelo también sugiere que animales que provienen de climas húmedos tienen mayor probabilidad de ser seropositivos, lo cual puede estar relacionado con que es una condición que favorece el desarrollo de diversas especies de garrapatas que pueden ser vectores de especies de *Rickettsia*. En nuestro estudio se encontraron los équidos con cuatro especies de garrapatas, a saber *D. nitens*, *A. cajennense* s.l., *Rh. microplus* y *A. ovale*. Las tres primeras especies han sido comúnmente reportadas en Colombia y en Brasil [34,35]; sin embargo, el hallazgo de *A. ovale* que tradicionalmente hace su ciclo en pequeños roedores en sus fases inmaduras o en canidos en fases adultas, sugiere la cercanía del équido con los hospederos de *A. ovale* previamente mencionados o a las condiciones ecológicas para su desarrollo [14,34,36,37].

Lo obtenido en los modelos deben considerarse bajo las condiciones y sesgos del muestreo y la selección de la muestra, el periodo de muestreo, los probables municipios de origen que están limitados a departamentos específicos, debido a que no controlábamos de cuales departamentos procedían los animales, las limitaciones de las pruebas, entre otras razones que pueden influir en los resultados.

Los hallazgos de este estudio indican zonas probables de circulación de *Rickettsia* a través del uso de los équidos como centinelas, lo cual contribuye al conocimiento y epidemiología de la exposición de a la Rickettsiosis en el país. Se espera que en las zonas identificadas se apliquen los protocolos de tratamiento con doxiciclina ante la sospecha de rickettsiosis humana y que se realicen estudios posteriores en humanos para complementar los resultados de este trabajo.

Referencias

- [1] Oteo JA, Nava S, Sousa R de, Mattar S, Venzal JM, Abarca K, et al. Guías Latinoamericanas de la RIICER para el diagnóstico de las rickettsiosis transmitidas por garrapatas. Rev Chil Infectología 2014;31:54–65.
- [2] Valbuena G, Walker DH. Infection of the endothelium by members of the order Rickettsiales. Thromb Haemost 2009;102:1071–9. doi:10.1160/TH09-03-0186.

- [3] Gillespie JJ, Williams K, Shukla M, Snyder EE, Nordberg EK, Ceraul SM, et al. Rickettsia phylogenomics: Unwinding the intricacies of obligate intracellular life. *PLoS One* 2008;3:21–7. doi:10.1371/journal.pone.0002018.
- [4] Dantas-Torres F. Rocky Mountain spotted fever. *Lancet Infect Dis* 2007;7:724–32. doi:10.1016/S1473-3099(07)70261-X.
- [5] CDC. Rocky Mountain Spotted Fever. *Statistics and Epidemiology* 2013;2014.
- [6] Pacheco OE, Giraldo MR, Martínez M, Hidalgo M, Galeano A, Echeverri I, et al. Estudio de brote febril hemorrágico en el corregimiento de Alto de Mulatos - Distrito Especial Portuario de Turbo, Antioquia, enero de 2008. *Inf Quinc Epidemiol Nac* 2008;13:145–60.
- [7] Szabo MPJ, Pinter A, Labruna MB, Szabó J, Pinter A, Labruna MB. Ecology, biology and distribution of spotted-fever tick vectors in Brazil. *Front Cell Infect Microbiol* 2013;3:27. doi:10.3389/fcimb.2013.00027.
- [8] Parola P, Paddock CD, Socolovschi C, Labruna MB, Mediannikov O, Kernif T, et al. Update on tick-borne rickettsioses around the world: A geographic approach. *Clin Microbiol Rev* 2013;26:657–702. doi:10.1128/CMR.00032-13.
- [9] Guglielmone AA, Robbins RG, Apanaskevich DA, Petney TN, Estrada-Peña A, Horak IG. *The Hard Ticks of the World*. 2014. doi:10.1007/978-94-007-7497-1.
- [10] Gonçalves F, Matos D, Thandile K, Boulsfield L, Pereira S, Soares S, et al. Serological survey of Rickettsia sp. in horses and dogs in a non-endemic area in Brazil. *Rev Bras Parasitol Veterinária* 2010;19:205–9.
- [11] Sangioni LA, Horta MC, Vianna MC, Gennari SM, Soares RM, Galvao MA, et al. Rickettsial infection in animals and Brazilian spotted fever endemicity. *Emerg Infect Dis* 2005;11:265–70. doi:10.3201/eid1102.040656.
- [12] Horta MC, Labruna MB, Sangioni LA, Vianna MC, Gennari SM, Galvao MA, et al. Prevalence of antibodies to spotted fever group rickettsiae in humans and domestic animals in a Brazilian spotted fever-endemic area in the state of Sao Paulo, Brazil: serologic evidence for infection by Rickettsia rickettsii and another spotted fever gro. *Am J Trop Med Hyg* 2004;71:93–7.

- [13] Bermúdez CSE, Zaldívar a Y, Spolidorio MG, Moraes-Filho J, Miranda RJ, Caballero CM, et al. Rickettsial infection in domestic mammals and their ectoparasites in El Valle de Antón, Coclé, Panamá. *Vet Parasitol* 2011;177:134–8.
- [14] Londoño AF, Acevedo-Gutiérrez LY, Marín D, Contreras V, Díaz FJ, Valbuena G, et al. Wild and domestic animals likely involved in rickettsial endemic zones of Northwestern Colombia. *Ticks Tick Borne Dis* 2017;8:887–94. doi:10.1016/j.ttbdis.2017.07.007.
- [15] Lizarazo D, Valbuena G, Hidalgo M, Vesga JF. A Survey of Antibodies against *Rickettsia rickettsii* and *Ehrlichia chafeensis* in Domestic Animals from a Rural Area of Colombia. *Am J Trop Med Hyg* 2018;80:1029–30. doi:10.4269/ajtmh.2009.80.1029.
- [16] Onmaz AC, Beutel RG, Schneeberg K, Pavaloiu AN, Komarek A, Van Den Hoven R. Vectors and vector-borne diseases of horses. *Vet Res Commun* 2013;37:65–81. doi:10.1007/s11259-012-9537-7.
- [17] Ueno TEH, Costa FB, Moraes-Filho J, Agostinho WC, Fernandes WR, Labruna MB. Experimental infection of horses with *Rickettsia rickettsii*. *Parasites and Vectors* 2016;9:499. doi:10.1186/s13071-016-1784-y.
- [18] Martin, T.M., 2006. Guide for determining the age of the horse, 6 Edition. ed. American Association of Equine Practitioners, Lexington -USA tick.
- [19] Henneke DR, Potter GD, Kreider JL, Yeates BF. Relationship between condition score, physical measurements and body fat percentage in mares. *Equine Vet J* 1983;15:371–2. doi:10.1111/j.2042-3306.1983.tb01826.x.
- [20] Barros Battesti D, Arzua M, Bechara GH, Barros-Battesti D, Arzua M, Bechara GH. Carrapatos De Importancia Médico-veterinaria Da Regiao Neotropical: Um Guia Ilustrado Para Identificação De Espécies. São Paulo, Brasil: Vox/ICTTD-3/Butantan; 2006.
- [21] Olson DM, Dinerstein, E., Wikramanayake, E. D., Burgess ND, Powell, G. V. N., Underwood, E. C., D'Amico JA, Itoua I, Strand HE, Morrison JC, et al. Terrestrial ecoregions of the world: a new map of life on Earth. *Bioscience* 2001;51:933–8.
- [22] Penman AD, Johnson WD. Complementary Log–Log Regression for the Estimation of Covariate-Adjusted Prevalence Ratios in the Analysis of Data from Cross-Sectional Studies. *Biometrical J* 2009;51:433–42. doi:10.1002/bimj.200800236.
- [23] Kulldorff M. A spatial scan statistic. *Commun Stat Methods* 1997;26:1481–96.

- [24] Quintero V. JC, Paternina T. LE, Uribe Y. A, Muskus C, Hidalgo M, Gil J, et al. Eco-epidemiological analysis of rickettsial seropositivity in rural areas of Colombia: A multilevel approach. *PLoS Negl Trop Dis* 2017;11:1–19. doi:10.1371/journal.pntd.0005892.
- [25] Souza CE, Camargo LB, Pinter A, Donalisio MR. High seroprevalence for *Rickettsia rickettsii* in equines suggests risk of human infection in silent areas for the Brazilian spotted fever. *PLoS One* 2016;11:11–9. doi:10.1371/journal.pone.0153303.
- [26] Ebani, VV. Serological Evidence of *Anaplasma phagocytophilum* and Spotted Fever Group *Rickettsia* spp. Exposure in Horses from Central Italy. *Pathogens*, 2019: 8(3), 88.
- [27] Quintero JC, Paternina LE, Uribe A, Muskus C, Hidalgo M, Gil J, et al. Eco-epidemiological analysis of rickettsial seropositivity in rural areas of Colombia: A multilevel approach. *PLoS Negl Trop Dis* 2017;11:19. doi:10.1371/journal.pntd.0005892.
- [28] Krawczak FS, Labruna MB, Hecht JA, Paddock CD, Karpathy SE. Genotypic Characterization of *Rickettsia bellii* Reveals Distinct Lineages in the United States and South America . *Biomed Res Int* 2018;2018:1–8. doi:10.1155/2018/8505483.
- [29] Arroyave E, Londoño A, Quintero JC, Agudelo-Florez P, Arboleda M, Díaz FJ, et al. Etiología y caracterización epidemiológica del síndrome febril no malárico en tres municipios del Urabá antioqueño, Colombia. *Biomédica* 2013;33:99–107. doi:10.7705/biomedica.v33i0.734.
- [30] Rivas JJ, Moreira-Soto A, Alvarado G, Taylor L, Calderón-Arguedas O, Hun L, et al. Pathogenic potential of a Costa Rican strain of «Candidatus *Rickettsia amblyommii*» in guinea pigs (*Cavia porcellus*) and protective immunity against *Rickettsia rickettsii*. *Ticks Tick Borne Dis* 2015. doi:10.1016/j.ttbdis.2015.07.008.
- [31] Alves ADS, Melo ALT, Amorim M V., Borges AMCM, Silva LGE, Martins TF, et al. Seroprevalence of *Rickettsia* spp. in Equids and Molecular Detection of “Candidatus *Rickettsia amblyommii*” in *Amblyomma cajennense* Sensus Lato Ticks From the Pantanal Region of Mato Grosso, Brazil. *J Med Entomol* 2014;51:1242–7. doi:10.1603/me14042.
- [32] Castagnolli KC, De Figueiredo LB, Santana DA, De Castro MB, Romano MA, Szabó MPJ. Acquired resistance of horses to *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) ticks. *Vet Parasitol* 2003;117:271–83. doi:10.1016/j.vetpar.2003.09.004.

- [33] Ferreira LL, Sarria ALF, de Oliveira Filho JG, de Silva F de O, Powers SJ, Caulfield JC, et al. Identification of a non-host semiochemical from tick-resistant donkeys (*Equus asinus*) against *Amblyomma sculptum* ticks. *Ticks Tick Borne Dis* 2019;10:621–7. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2019.02.006>.
- [34] Labruna MB, Kerber CE, Ferreira F, Faccini JLH, De Waal DT, Gennari SM. Risk factors to tick infestations and their occurrence on horses in the state of São Paulo, Brazil. *Vet Parasitol* 2001;97:1–14. doi:10.1016/S0304-4017(01)00387-9.
- [35] Acevedo-Gutiérrez LY, Pérez-Pérez JC, Paternina LE, Londoño AF, López G, Rodas JD. Garrapatas duras (Acari: Ixodidae) de Colombia, una revisión a su conocimiento en el país. *Acta Biológica Colomb* 2020;25.
- [36] Santodomingo A, Sierra-Orozco K, Cotes-Perdomo A, Castro LR. Molecular detection of *Rickettsia* spp., *Anaplasma platys* and *Theileria equi* in ticks collected from horses in Tayrona National Park, Colombia. *Exp Appl Acarol* 2019;77:411–23. doi:10.1007/s10493-019-00354-8.
- [37] Guglielmone AA, Robbins RG, Apanaskevich D, Petney T, Estrada-Peña A, Horak I. *The Hard Ticks of the World (Acari: Ixodida: Ixodidae)*. 1st ed. Netherlands: Springer Netherlands; 2014. doi:10.1007/978-94-007-7497-1.

Capítulo 3.

Detección molecular de *Rickettsia* spp. en garrapatas de équidos y aislamiento de “*Candidatus Rickettsia franklinii*”, una nueva especie del grupo ancestral en el noroeste de Colombia

Resumen

Las garrapatas pueden transmitir una amplia diversidad de agentes, entre ellas están las bacterias del género *Rickettsia*, las cuales pueden ser detectadas a través de técnicas moleculares o cultivos celulares. En Colombia se han reportado especies de *Rickettsia* de los grupos de las fiebres manchadas, transicional y tifo en garrapatas en algunas áreas, pero aún se desconocen cómo es la frecuencia de infección en garrapatas del noroeste infestando a équidos. Dado lo anterior se tuvo como objetivo determinar la proporción de infección de las especies de *Rickettsia* en garrapatas en el noroeste de Colombia, a través del uso de técnicas moleculares como PCR en tiempo real y convencional, y ensayos de aislamiento a partir de garrapatas de équidos. Se evidenció una proporción de infección en las garrapatas del 2,6%. detección y diagnóstico, que han favorecido la identificación de nuevas patologías o microorganismos. Se detectaron cuatro especies de *Rickettsia* de los grupos ancestral, transicional y de las fiebres manchadas en el noroeste de Colombia en garrapatas de équidos. Se detectó y aisló una especie de *Rickettsia* que se propone como una nueva especie del grupo ancestral y que denominó “*Candidatus R. franklinii*”. Las restantes especies fueron una *Rickettsia* sp. cercana a “*Candidatus R. mendelii*”, *R. felis* y “*Candidatus R. colombianensi*”. Las garrapatas positivas correspondieron a *Amblyomma patinoi*, *Amblyomma mixtum* y *Rhipicephalus microplus*. Estos hallazgos refuerzan la importancia de realizar estudios adicionales para determinar el papel de estas rickettsias y sus potenciales vectores, en la epidemiología de la rickettsiosis en el noroeste del país.

Palabras claves: Garrapatas, Infestación, Rickettsiae, pruebas moleculares, cultivos celulares, *Amblyomma cajennense*

Introducción

Las garrapatas juegan un reconocido papel como vector de diversos patógenos para el hombre y animales, tales como los virus, las bacterias y los protozoos [1]. Entre estos agentes, cobran importancia las especies del género *Rickettsia* de los grupos ancestral (GA), el grupo transicional (GT), y el grupo de las fiebres manchadas (GFM) [2].

El GFM reviste especial importancia por estar conformado por algunas rickettsias patógenas, que causan diferentes enfermedades potencialmente mortales como la fiebre manchada de las Montañas Rocosas (FMMR) y la fiebre manchada del Mediterráneo [3]. La fiebre manchada de las Montañas Rocosas, causada por *Rickettsia rickettsii* se ha reportado en el continente americano en países como Canadá, Estados Unidos, México, Costa Rica, Panamá, Colombia, Brasil y Argentina [4]. En Colombia durante los años de 1934 y 1936 se presentó un brote de enfermedad febril con un porcentaje de fatalidad del 95% en la localidad de Tobia (Cundinamarca) [5]. Después de este reporte, las rickettsiosis no se siguieron reportando en el país hasta que en 2007 se publicó un registro de dos casos mortales retrospectivos por FMMR en Cundinamarca y se empezaron a detectar brotes en Necoclí (Antioquia) en el 2006, Los Córdoba (Córdoba) en el 2007 y en Turbo (Antioquia) en el 2008, que cursaron con letalidades del 27 al 54%. Lo anterior promovió el estudio de estos agentes en el país, como lo evidencian los trabajos llevados a cabo en los departamentos de Cundinamarca, Antioquia, Córdoba, La Guajira y Meta, entre otros [6–11].

La detección del número de agentes transmitidas por garrapatas (ATG) en el mundo, entre las cuales se cuenta las especies de *Rickettsia*, se encuentran en aumento debido en parte a la mejora en los sistemas de vigilancia, detección y diagnóstico, que han favorecido la identificación de nuevas patologías o agentes etiológicos [12]. A lo anterior se han sumado procesos como el cambio climático, la deforestación, la pérdida de la biodiversidad y procesos migratorios tanto de animales como del hombre, entre otros, que han favorecido a la dispersión y determinación de crecientes incidencias de ATG [13,14].

Las investigaciones en Colombia gradualmente han permitido identificar la diversidad de especies de *Rickettsia* circulando en las garrapatas del país. Especies tales como *R. rickettsii*, "*Candidatus R. colombianensi*", *R. belli*, *R. parkeri* cepa Atlantic rainforest, *R. felis*, *R. amblyommatis*, "*Candidatus R. andeanae*" y *R. rhipicephali* se han encontrado en garrapatas como *A. cajennense*, *A. ovale* y *Rh. microplus*, entre otras [15–20]; evidenciando la presencia de diversas especies patógenas reconocidas y otras con patogenicidad desconocida de los GA, GT y GFM, lo cual proporciona importantes elementos en el conocimiento del escenario epidemiológico de la rickettsiosis en Colombia para favorecer su promoción, prevención y control. A pesar de este conocimiento, aún el panorama no es totalmente conocido en el país, especialmente en algunas regiones donde las investigaciones no se han realizado o son incipientes. Dadas

las condiciones anteriores, nos propusimos en este trabajo como objetivo determinar la proporción de infección de las especies de *Rickettsia* en garrapatas de équidos del noroeste de Colombia.

Metodología

Recolección de garrapatas

Se realizó un estudio descriptivo donde se recolectaron garrapatas en équidos que fueron llevados a la planta de beneficio La Rinconada (Rionegro, Antioquia) y enmarcado en el proyecto “Équidos como centinelas de *Rickettsia* en Colombia” CODI 321-2014. La recolección se realizó con un esfuerzo de muestreo de siete minutos por équido (*Equus asinus*, *Equus caballus* y *Equus asinus* x *Equus caballus*), dos minutos de los cuales fueron destinados a la zona de orejas, crin y cola, y los minutos restantes para la parte inferior del cuerpo del animal, con el fin de maximizar la probabilidad de encontrar ejemplares del complejo *A. cajennense*. Las garrapatas se recolectaron durante un año (junio 2015—junio 2016), se procuró llevarlas vivas al laboratorio del grupo de investigación Centauro, donde se clasificaron por claves taxonómicas para larvas, ninfas y adultos [21–23]. Las garrapatas vivas se lavaron con alcohol yodado por 10 minutos seguido de cuatro inmersiones en PBS estéril por 5 minutos, se cortaron sagitalmente guardando una fracción para extracción de ADN y la otra para ensayos de aislamiento. Las garrapatas muertas se guardaron en isopropanol hasta el momento de extracción de ADN. Los ejemplares de *D. nitens* se almacenaron por pools de máximo 5 garrapatas, las restantes especies se procesaron individualmente [24].

Detección molecular y aislamiento

Se realizó la extracción del ADN por el método de GT siguiendo instrucciones de Sangioni y colaboradores [25]. Para descartar inhibidores en el ADN extraído se utilizó el gen 16s mt rRNA de garrapatas [26]. Para la detección molecular se realizó un abordaje por PCR en tiempo real (qPCR) y convencional para aumentar la sensibilidad de las pruebas, usando para tamizaje el gen de citrato sintetasa (*gltA*) respectivamente [27]. La qPCR se realizó con la enzima 5x Hot Firepol de Solis Biodine® con la prueba reportada por Labruna usando una sonda Taqman siguiendo las indicaciones de Ueno y colaboradores (2016) [28] en el equipo AriaMx de Agilent ®. A todas las muestras positivas por qPCR se les realizó PCRs convencionales para la caracterización y detección del género y/o especie de *Rickettsia*. Para determinar la especie de garrapata en el caso de *A. cajennense* s.l solo se usó PCR convencional (Tabla 3.1). En cada ensayo de PCR (qPCR

y convencional) se utilizaron dos controles negativos con agua grado molecular y como control positivo se usó *Rickettsia massilae* (especie que no se espera esté circulando en Colombia) donado por el Dr. Santiago Nava del INTA de Argentina.

Las PCR convencionales se realizaron con la enzima TaqPlatinum de Invitrogen ®. Los genes buscados para tamizar y caracterizar las muestras, los cebadores y las temperaturas de alineamiento se presentan en la tabla 3-1. A la fracción complementaria de las garrapatas positivas por PCR se les realizó ensayos de Shell vial en células Vero siguiendo instrucciones previamente descritas por Pacheco y colaboradores [29]. La técnica del Shell vial consiste en sembrar una capa de células Vero en un vial de vidrio y poner en contacto con la garrapata triturada, esperando por 28 días para observar el crecimiento de *Rickettsia*. En caso de darse el crecimiento, se continúa el mantenimiento en monocapa en un sistema de cultivo celular tradicional.

Tabla 3-1. Lista de genes, cebadores, tamaño amplificado y temperatura de alineamiento.

Gen	Cebadores	Secuencia	Tamaño (pb)	T (°C)	Ref.
16S mt rRNA (Garrapata)	16+	CCGGTCTGAACTCAGATCAAGT	472	50	[30]
	16-	GCTCAATGATTTTTTAAATTGCTGTGG			
12S rRNA (Garrapata)	T1B	AAACTAGGATTAGATACCCT	403	53	[31]
	T2A	AATGAGAGCGACGGGCGATGT			
16S rRNA (Género <i>Rickettsia</i>)	fD1	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	426	56	[32,33]
	Rc16S.452n	AACGTCATTATCTTCCTTGC			
gltA (<i>Rickettsia</i> grupo)	CS5*	GAGAGAAAATTATATCCAAATGTTGAT	147	60	[27,34]
	CS6*	AGGGTCTTCGTGCATTTCTT			
		6- FAMd(CATTGTGCCATCCAGCCTACGGT) BHQ-1 3			
	CS78	GCAAGTATCGGTGAGGATGTAAT	401	48	[27]
	CS323	GCTTCCTTAAAATTCAATAAATCAGGAT			
	CS372	TTTGTAGCTCTTCTCATCCTATGGC	617	58	[35]
	CS989	CCCRAGTTCCTTTAATACTTCTTTGC			
	CS877	GGGGCCTGCTCACGGCGG	381	48	[36]
	CS1258	AATGCAAAAAGTACAGTGAACA			
	CS239	GCTCTTCTCATCCTATGGCTATTAT	834	54	[27]
CS1069	CAGGGTCTTCGTGCATTTCTT				
Sca5(ompB) (Género <i>Rickettsia</i>)	120-M59	CCGCAGGGTTGGTAACTGC	862	54	[37]
	120-807	CCTTTTAGATTACCGCCTAA			
	rompB OF	GTAACCGGAAGTAATCGTTTCGTAA	511	54	[38]
	rompB OR	GCTTTATAACCAGCTAAACCACC			
	rompB SFG IF	GTTTAATACGTGCTGCTAACCAA	420	56	
rompB SFG IR	GGTTTGGCCATATACCATAAG				
Sca0(OmpA) (GFM)	190-70p	ATGGCGAATATTTCTCCAAA	631	46	[39,40]
	190-701	GTTCCGTTAATGGCAGCATCT			
Sca4 (Género <i>Rickettsia</i>)	D1f	ATGAGTAAAGACGGTAACCT	928	50	[41]
	D928r	AAGCTATTGCGTCATCTCCG			
htrA (17kDa) (Género)	17KdsF	GCTCTTGCAACTTCTATGTT	439	56	[42]
	17KdsR	CATTGTTCTGCAGGTTGGCG			

Rickettsia

*Usados para PCR en Tiempo real

Análisis filogenético

Los productos de amplificación por PCR convencional se enviaron a secuenciar por el método Sanger a MacroGen® y fueron comparados con secuencias disponibles (>100 secuencias disponibles) a través de BLASTn (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) [43]. Los cromatogramas de secuencias nucleotídicas se editaron manualmente para verificar los polimorfismos nucleotídicos hallados y la secuencia consenso por cada muestra fue analizada con el software MEGA 7.0. Las diferentes secuencias fueron sometidas a alineamientos múltiples utilizando el algoritmo Clustal W para generar matrices de disimilitud con las cuales se calcularon las distancias genéticas totales, se calculó el mejor modelo de sustitución nucleotídica y se realizaron los dendrogramas. Se construyó un árbol consenso para las especies candidatas por el método de Neighbor-Joining con un bootstrap de 10000. Para las demás especies se construyeron arboles con las secuencias parciales de los genes *gltA* con los cebadores CS78-CS323 y *Sca5(ompB)* con 120-M59 y 120-807 por el método de Neighbor-Joining y Máxima verosimilitud, respectivamente y con un bootstrap de 10000. En el material suplementario (S-1 y S-2) se presentan las secuencias del Genbank utilizadas para la construcción de los dendrogramas y las secuencias obtenidas con su respectivo código designado en el GenBank.

Análisis estadístico

Se realizó un análisis descriptivo de las garrapatas, su municipio de origen, sus hospederos e infección, a través del cálculo del porcentaje mínimo de infección. Las variables cualitativas se expresaron en frecuencias absolutas y relativas, y las cuantitativas con medianas y sus respectivos rangos intercuartílicos. Los análisis se realizaron en SPSS v21.0 y QGIS 3.0.

Resultados

Se obtuvo un total de 3307 garrapatas, las cuales correspondían a *D. nitens* (n=2376), seguido de especies del complejo *A. cajennense* (*A. mixtum* y *A. patinoi*) (n=760), *Rhipicephalus microplus* (n=170) y *Amblyomma ovale* (n=1). Todas las especies se procesaron individualmente, excepto para *D. nitens* de la cual se procesó por cada municipio un aproximado de un 10% seleccionado al azar (n=543), para un total de 1474 garrapatas en 958 pools. El municipio de origen y las especies de hospederos se presentan en el Figura 3-1 y la tabla 3-2.

Se obtuvieron 38 muestras positivas por PCR convencional y tiempo real para un porcentaje mínimo de infección en las garrapatas del 2.6% (Figura 3-2). Por tiempo real se identificaron 32 ADNs positivos para una infección del 2.2% con una mediana de ciclo del umbral (Ct) igual a 35.7 (Rango intercuartílico: ± 2.2), y por convencional se identificaron 23 para un porcentaje de 1.6%, obteniéndose 17 muestras con amplificación por ambas técnicas.

De las 23 muestras obtenidas por PCR convencional, se logró obtener por secuenciación, un acercamiento a la especie en 16 amplicones, los cuales correspondieron a: *Rickettsia felis* (n=9), "*Candidatus R. colombianensi*", (n=5), una especie cercana a la "*Candidatus R. mendelii*" (n=1) y una nueva especie candidata a la cual se le propone como nombre "*Candidatus R. franklinii*" en honor a la Dra. en Química Física, Rosalind Franklin (científica inglesa que realizó aportes importantes para determinar la estructura del ADN). Vale anotar que esta última candidata fue la única de la cual se logró el aislamiento por la técnica del Shell vial de los 33 intentos realizados y se encuentra en el repositorio del laboratorio del profesor Marcelo Labruna en la Universidad de Sao Paulo (Departamento de Medicina Veterinaria Preventiva e Salud Animal – VPS, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia – FMVZ). En las restantes siete muestras no se logró identificar la especie por la longitud o calidad de las secuencias o de los productos.

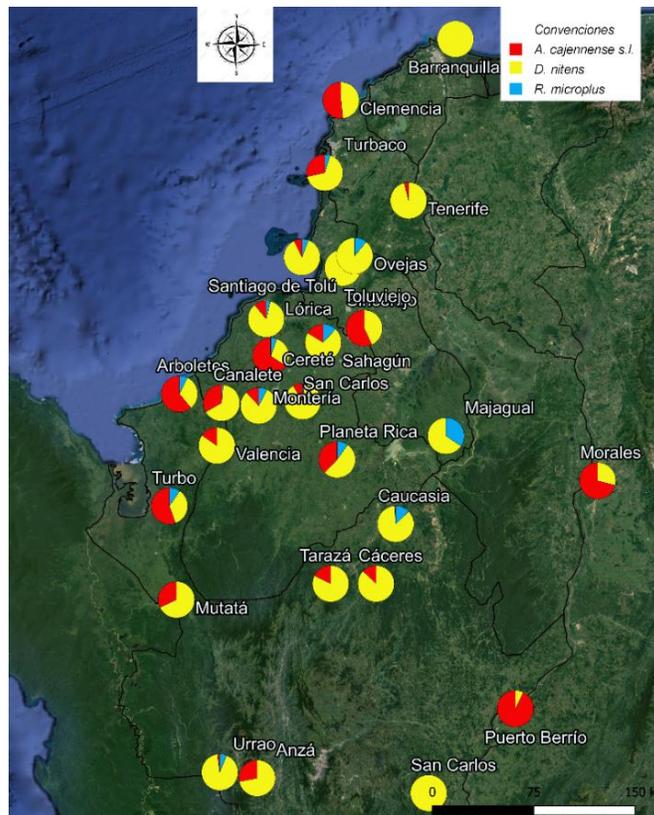


Figura 3-1. Municipios de origen y proporciones de las especies de garrapatas recolectadas.

En la figura 3-3 se muestran los dendrogramas de algunas de las amplicones obtenidos, donde se identifican que las secuencias obtenidas se agrupan en las cladas de *Rickettsia felis* y de “*Candidatus R. colombianensi*” para el gen *gltA*, las restantes secuencias se agrupan cercanas a *R. bellii* para el caso de “*Candidatus R. franklinii*” y al “*Candidatus R. mendelii*” para *Rickettsia* sp como se puede observar en el árbol de secuencias concatenadas. Las secuencias obtenidas se ingresaron al Genbank con los códigos MN817133 al MN817159 (Material suplementario S-2).

De dos garrapatas *A. patinoi* recolectadas en *E. caballus* de Montería (Córdoba) se obtuvieron secuencias de las especies candidatas obtenidas. De la secuencia cercana al “*Candidatus R. mendelii*”, se lograron amplificar secuencias para los genes *16S rRNA* y *gltA* (CS239-CS1069), los demás genes no amplificaron (*ompA*, *ompB*, *Sca4*, *17kDa*). En los dendrogramas se puede identificar que estas secuencias forman una clada entre *R. canadensis* del GA y *R. typhi* del GT. Se obtuvo para esta muestra un porcentaje de identidad máximo del 96 y 97.1% en una secuencia de 375 nucleótidos del *16S rRNA* para las especies *R. canadensis* y *R. typhi*; y del 87.1 y 86.8% en una secuencia de 796 nucleótidos del *gltA* para las especies antes comparadas. Dada la longitud de la rama, los porcentajes de identidad y el árbol filogenético, podemos sospechar que es probablemente una nueva especie del GA pero se requiere mayor datos genéticos y lograr el aislamiento para confirmar esta propuesta.

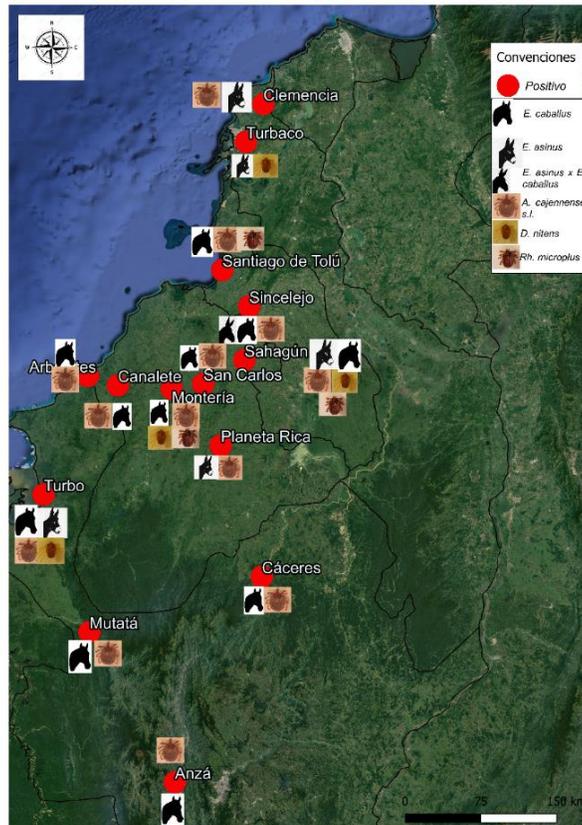


Figura 3-2. Mapa donde se muestra los municipios, hospederos y garrapatas con muestras positivas.

Para el caso de la “*Candidatus R. franklinii*” se obtuvieron secuencias de los genes *gltA* (1104 nucleótidos), *16S rRNA* (375 nucleótidos) y *17kDa* (393 nucleótidos), obteniéndose unos porcentajes máximos de identidad con *R. bellii* (la especie más cercana de las especies de *Rickettsia*) del 88.4, 98.9 y 84.5%, respectivamente. Los genes *ompA*, *ompB*, y *Sca4* no fue posible amplificarlos a partir de los cultivos y del ADN de la garrapata. Por el árbol consenso (Figura 2-3) y siguiendo los criterios de Fournier [44] para definir nuevas especies de *Rickettsia* del grupo ancestral (*16S rRNA* y *gltA*) podemos identificar que esta nueva especie se ubica en el GA, en la clada de *Rickettsia bellii*.

En la tabla 3-2 se resumen las características más importantes de las muestras positivas por PCR convencional

Tabla 3-2. Datos de las muestras positivas con secuencias por PCR convencional.

Código	Especie de garrapata	Hospedero	Departamento	Municipio	Especie
T229	<i>A. patinoi</i>	<i>E. caballus</i>	Antioquia	Anzá	“Ca R. colombianensi”
T235	<i>A. patinoi</i>	<i>E. caballus</i>	Antioquia	Anzá	“Ca R. colombianensi”
T232	<i>A. patinoi</i>	<i>E. caballus</i>	Antioquia	Anzá	<i>R. felis</i>
T311	<i>A. patinoi</i>	<i>E. caballus</i>	Antioquia	Arboletes	<i>R. felis</i>
T309	<i>A. mixtum</i>	<i>E. caballus</i>	Antioquia	Cáceres	<i>R. felis</i>
T14	<i>A. patinoi</i>	<i>E. caballus</i>	Antioquia	Mutatá	<i>R. felis</i>
T341	<i>A. patinoi</i>	<i>E. asinus</i>	Córdoba	Planeta Rica	“Ca R. colombianensi”
T324	<i>A. patinoi</i>	<i>E. asinus</i>	Antioquia	Turbo	“Ca R. colombianensi”
T523	<i>Rh. microplus</i>	<i>E. caballus</i>	Antioquia	Turbo	<i>R. felis</i>
T955	<i>A. patinoi</i>	<i>E. caballus</i>	Córdoba	Canalete	<i>R. felis</i>
T41	<i>A. patinoi</i>	<i>E. caballus</i>	Córdoba	Montería	Cercana a “Ca R. mendelii”
T46	<i>A. patinoi</i>	<i>E. caballus</i>	Córdoba	Montería	“Ca R. franklinii”
T18	<i>A. patinoi</i>	<i>E. caballus</i>	Córdoba	Montería	<i>R. felis</i>
T21	<i>A. mixtum</i>	<i>E. caballus</i>	Córdoba	Montería	<i>R. felis</i>
T05	<i>A. patinoi</i>	<i>E. asinus</i>	Córdoba	Sahagún	“Ca R. colombianensi”
T472	<i>A. patinoi</i>	<i>E. asinus x E. caballus</i>	Sucre	Sincelejo	<i>R. felis</i>

Ca= *Candidatus*

Identificación de potenciales áreas de riesgo de rickettsiosis en el noroeste de Colombia a través del uso de équidos como centinelas

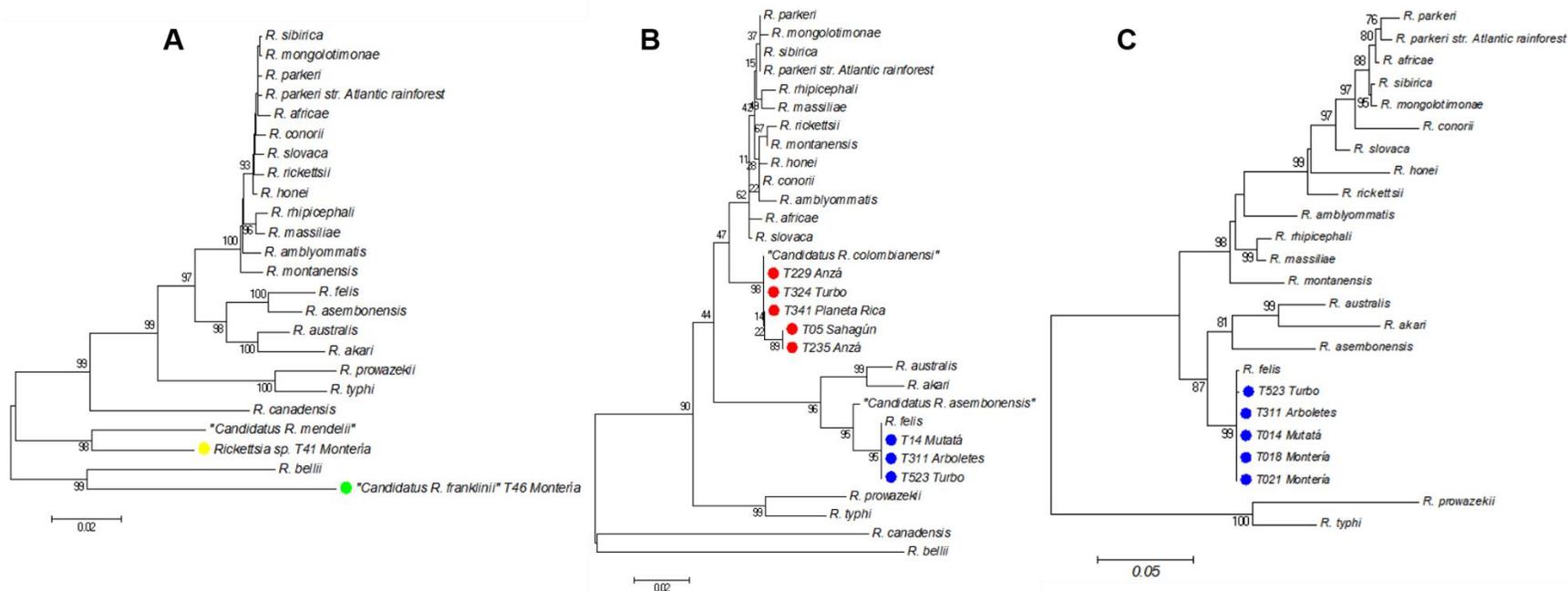


Figura 3-3. Dendrogramas de los genes concatenados *gltA*, *htrA* y *16S rRNA* de las secuencias de las especies candidatas (A), y para los genes *gltA* (B) y *ompB* (C) de las demás especies descritas en este estudio y de las especies de rickettsias de los GFM, GT, GT y GA. El análisis fue realizado por el método de Neighbor-Joining con el modelo de sustitución Tamura-nei 3 parámetros con distribución gamma (T92+G) para todos los árboles A y B. El árbol C se realizó por el método de Máxima verosimilitud con modelo de sustitución General Time Reversible con distribución gamma (GTR+G). Los soportes de rama fueron generados por bootstrap (10000 réplicas). Los dendrogramas fueron enraizados en el punto medio. Los alineamientos finales tenían un total de 1905 nucleótidos para A, 318 nucleótidos para B y 747 nucleótidos para C. El análisis fue realizado el programa MEGA 7.

Discusión

Reportes en Colombia han demostrado la presencia de diversas especies de *Rickettsia* en garrapatas. En este trabajo se encontraron garrapatas de équidos infectadas con cuatro especies de los GA, GT y GFM. El porcentaje de infección mínima general fue de 2.6% (38/1474), que se puede considerar baja y que es coherente con estudios previamente realizados en la región donde se encontró un porcentaje del 5% en el Urabá antioqueño [24]. Nuestro trabajo contrasta con el realizado en el departamento del Magdalena donde se reportó un porcentaje general del 29.5% (18/61), y del 25.5% (14/55) considerando las especies de garrapatas halladas en nuestro estudio (*A. cajennense* s.l., *D. nitens* y *Rh. microplus*) [19,24]. Estos resultados pueden deberse a diferencias ecológicas entre las zonas de estudio, lo cual puede incluir el tipo de especie de *Rickettsia* y de las especies del complejo *A. cajennense* que circula en la zona. Respecto a las especies de *Rickettsia* halladas en el estudio del Magdalena, se detecta la presencia de *R. rhipicephali* que se ha reportado previamente en Brasil infectando un 40% de *Amblyomma* sp. Respecto a las especies del complejo, en ese mismo estudio se identificó a *A. mixtum* como la especie del complejo *A. cajennense* local, mientras que en nuestro caso fue *A. patinoi* la más representativa, lo cual puede tener un efecto sobre el mantenimiento de diversas especies de *Rickettsia* [45].

Se evidenció que la mayoría de las garrapatas infectadas fueron del complejo *A. cajennense*, lo que sugiere su participación en el manteniendo de diversas especies de *Rickettsia* como *R. amblyommatis* y no solo de *R. rickettsii* donde se ha vinculado como potencial vector importante, incluso en países como Brasil y México donde se pueden encontrar las garrapatas infectadas [46-48]. La presencia de las especies *A. patinoi* y *A. mixtum* en la zona de estudio es lo esperado considerando que la zona del noroeste del país puede ser un área de encuentro de las especies, dado que la distribución de *A. mixtum* se reporta desde el Sur de Estados Unidos hasta Ecuador, y la de *A. patinoi*, en el centro de Colombia [49-51].

R. felis se ha reportado previamente en diversos artrópodos, como es el caso de las garrapatas como *A. cajennense* s.l., *Rh. sanguineus* s.l., entre otras [1], e incluso en diferentes sustratos, lo cual puede explicar el alto número de muestras positivas en este estudio. En Colombia previamente se había reportado en pulgas, pero no se tenía reporte en garrapatas, aunque su impacto en el panorama de la rickettsiosis en el país aún sea incierto [52]. La patogenicidad de esta bacteria es discutida a razón de su amplia

distribución en diversas muestras, lo que permite soportar que posiblemente es un simbionte, pese a que se han dado reportes de humanos infectados [53,54]. Se espera que a futuro la evidencia científica soporte con mayor claridad la patogenicidad de esta *Rickettsia*, por el momento podemos indicar que esta especie está circulando en garrapatas de équidos del noroeste de Colombia y que estudios recientes se ha encontrado en sangre de équidos de Nicaragua [55].

Previamente en el noroeste de Colombia, específicamente en los departamentos del Córdoba, Antioquia y Magdalena, se reportó la “*Candidatus R. colombianensi*”, en *Amblyomma dissimile*, *A. cajennense* s.l. y *Rh. microplus*, en el presente estudio, en la cual fue hallada en *A. patinoi*. Esta bacteria del GFM parece tener una amplia distribución, como lo demuestra sus reportes en otros departamentos del país como Meta y Casanare, y sus hallazgos en países como, por ejemplo, Brasil y México [56–59]. La ubicación de la bacteria en el GFM nos hace sospechar de un potencial papel como un agente que genera exposición, infectividad o patogenicidad, lo cual impactaría en el panorama de la rickettsiosis en el país como puede ser inmunoprotección o inmunopotenciación, máxime aún, junto con el hecho de que algunos équidos tuvieron evidencia serológica de exposición por esta especie o alguna cercana como se demostró en el capítulo anterior.

El hallazgo de dos posibles nuevas especies del GA en garrapatas de equinos amplía la diversidad de especies en el país. El impacto de estas posibles nuevas especies debe ser analizada a futuro y en perspectiva de su papel en posible infección en hospederos vertebrados, esto soportado por el alto porcentaje de seropositividad en los équidos encontrados en el capítulo previo. Se puede sospechar que al igual a lo que sucede en el GFM, las especies del GA pueden causar respuesta inmunológica compartida entre las especies del grupo [57]. Estos hallazgos sugieren la capacidad infectiva e inmunogénica de las especies de *Rickettsia* del GA, pero aún es necesario descartar su capacidad patogénica, aunque se sospeche que es ausente, como se ha propuesto para *R. bellii*. Estudios experimentales en Brasil sugieren que *R. bellii* no es patogénica y que no protege a los hospederos vertebrados en infecciones con especies patogénicas como *R. rickettsii* [61].

La “*Candidatus R. mendelii*” fue reportada en el año 2016 en República Checa en garrapatas *Ixodes ricinus* recolectadas de caninos y aves, posteriormente a este reporte, se ha referenciado en diferentes partes del mundo como Eslovaquia, Polonia, Rumania y

Ucrania en la misma garrapata [62–67]. Recientemente se reportó en Estados Unidos en *Ixodes brunneus* recolectadas de aves [67]. En nuestro estudio encontramos una posible nueva especie cercana a esta candidata, lo cual indica una amplia diversidad de especies del GA.

Los resultados moleculares y los ensayos de aislamiento a partir de un espécimen de *A. patinoi* permitieron identificar una nueva especie, la “*Candidatus R. franklinii*”, que se ubica en el GA y es cercana a *R. bellii*, cumpliendo con los criterios formulados por Fournier en el 2009 [44]. Su ubicación en este grupo puede sugerirnos un posible papel como endosimbionte de la garrapata, sin embargo, se requieren estudios que permitan la identificación de elementos importantes en su ecología, tales como su mantenimiento en la garrapata, efecto en el hospederos invertebrados y vertebrados.

En estudios epidemiológicos, el uso en conjunto de diferentes blancos y técnicas moleculares, son una buena opción para realizar la detección de la bacteria, y esto aunado a la utilización del aislamiento en cultivos celulares, permite lograr una adecuada caracterización de las especies. En nuestro caso, estas estrategias permitieron la detección y caracterización de diversas especies de *Rickettsia*, superando y abordando las dificultades propias del modelo de infección, como es el caso de bajos porcentajes de infección y presencia de inhibidores, vale recordar que solo se logró el aislamiento en un ensayo [26,68]. En algunas muestras no fue posible obtener amplicones o productos de adecuada calidad para la secuenciación, debido en parte a la diferencia de la sensibilidad de las técnicas empleadas, posible baja cantidad de ADN de *Rickettsia* como se puede deducir de los Ct obtenidos en qPCR, a procesos de degradación del ADN, a posible divergencia en la secuencia respecto al cebador, e incluso a la ausencia de algunos genes en las muestras procesadas [69].

A través del uso de técnicas moleculares y de aislamiento se detectaron cuatro especies de *Rickettsia* en el noreste de Colombia, a saber, *R. felis*, “*Candidatus R. colombianensi*”, “*Candidatus R. franklinii*” y una cercana a “*Candidatus R. mendelii*”. Estos hallazgos complementan la diversidad de especies en garrapatas reportada en esa región del país, como *R. parkeri* cepa Atlantic rainforest, *R. amblyommatis*, y *R. rhipicephali*, entre otras [17,19,70]. Es necesario realizar estudios adicionales para determinar el papel de estas potenciales rickettsias patógenas y sus potenciales vectores en el escenario epidemiológico de la rickettsiosis en el noroeste del país.

Referencias

- [1] Dantas-Torres F, Chomel BB, Otranto D. Ticks and tick-borne diseases: A One Health perspective. *Trends Parasitol* 2012;28:437–46. doi:10.1016/j.pt.2012.07.003.
- [2] Quintero-Vélez JC, Hidalgo M, Rodas-González JD. Rickettsiosis , una enfermedad letal emergente y re-emergente en Colombia. *Univ Sci* 2012;17:82–99.
- [3] Gillespie JJ, Williams K, Shukla M, Snyder EE, Nordberg EK, Ceraul SM, et al. Rickettsia phylogenomics: Unwinding the intricacies of obligate intracellular life. *PLoS One* 2008;3:21–7. doi:10.1371/journal.pone.0002018.
- [4] Dantas-Torres F. Rocky Mountain spotted fever. *Lancet Infect Dis* 2007;7:724–32. doi:10.1016/S1473-3099(07)70261-X.
- [5] Patino-Camargo L. Nuevas observaciones sobre un tercer foco de fiebre petequial (maculosa) en el hemisferio americano. *Boletín La Of Sanit Panam* 1941;20:1112–24.
- [6] Patino L, Afanador A, Paul JH. A Spotted Fever in Tobia, Colombia: Preliminary Report. *Am J Trop Med Hyg* 1937;s1-17:639–53.
- [7] Pacheco O, Giraldo M, Martinez M, Hidalgo M, Galeano A, Echeverri E, et al. Estudio de brote febril hemorrágico en el corregimiento de Alto de Mulatos - Distrito Especial Portuario de Turbo, Antioquia, enero de 2008. *Inf Quinc Epidemiol Nac* 2008;13:145-60. Spanish.
- [8] Hidalgo M, Orejuela L, Fuya P, Carrillo P, Hernandez J, Parra E, et al. Rocky mountain spotted fever, Colombia. *Emerg Infect Dis* 2007;13:1058–60. doi:10.3201/eid1307.060537.
- [9] Ortiz J, Miranda J, Ortiz L, Navarro Y, Mattar S. Seroprevalencia de Rickettsia sp. en indígenas Wayuü de la Guajira y Kankuamos del Cesar, Colombia. *Infectio* 2015;19:18–23. doi:10.1016/j.infect.2014.11.003.
- [10] Londoño AF, Acevedo-Gutiérrez LY, Marín D, Contreras V, Díaz FJ, Valbuena G, et al. Human prevalence of the spotted fever group (SFG) rickettsiae in endemic zones of Northwestern Colombia. *Ticks Tick Borne Dis* 2017;8:477–82.
- [11] Gómez-Quintero CH, Faccini-Martínez ÁA, Botero-García CA, Lozano M, Sánchez-Lerma L, Miranda J, et al. Probable case of spotted fever group rickettsial infection in a new suspected endemic area, Colombia. *J Infect Public Health* 2017;10:353–6. doi:https://doi.org/10.1016/j.jiph.2016.08.012.

- [12] De la Fuente J, Estrada-Peña A. Ticks and tick-borne pathogens on the rise. *Ticks Tick Borne Dis* 2012;3:115–6. doi:10.1016/j.ttbdis.2012.03.001.
- [13] Jones K., Patel N., Levy M., Storeygard A, Balk D, Gittleman J., et al. Global trends in emerging infectious diseases. *Nature* 2008;451:990–3. doi:10.1038/nature06536.
- [14] Parola P, Socolovschi C, Jeanjean L, Bitam I, Fournier PE, Sotou A, et al. Warmer weather linked to tick attack and emergence of severe Rickettsioses. *PLoS Negl Trop Dis* 2008;2:1–8. doi:10.1371/journal.pntd.0000338.
- [15] Faccini-Martínez A, Costa F, Hayama-Ueno T, Ramírez-Hernández A, Cortés-Vecino J, Labruna M, et al. *Rickettsia rickettsii* in *Amblyomma patinoi* Ticks, Colombia. *Emerg Infect Dis* 2015;21:537–9. doi:10.3201/eid2013.140721.
- [16] Miranda J, Mattar S. Molecular detection of *rickettsia bellii* and *rickettsia* sp. strain *colombianensi* in ticks from Cordoba, Colombia. *Ticks Tick Borne Dis* 2014;5:208–12. doi:10.1016/j.ttbdis.2013.10.008.
- [17] Londoño AF, Díaz FJ, Valbuena G, Gazi M, Labruna MB, Hidalgo M. Infection of *Amblyomma ovale* by *Rickettsia* sp. strain Atlantic rainforest, Colombia. *Ticks Tick Borne Dis* 2014;5. doi:10.1016/j.ttbdis.2014.04.018.
- [18] Faccini ÁA, Ramírez-Hernández A, Forero-Becerra E, Cortés-Vecino JA, Escandón P, Rodas JD, et al. Molecular Evidence of Different *Rickettsia* Species in Villeta, Colombia. *Vector-Borne Zoonotic Dis* 2016;16:85–7. doi:10.1089/vbz.2015.1841.
- [19] Santodomingo A, Sierra-Orozco K, Cotes-Perdomo A, Castro LR. Molecular detection of *Rickettsia* spp., *Anaplasma platys* and *Theileria equi* in ticks collected from horses in Tayrona National Park, Colombia. *Exp Appl Acarol* 2019;77:411–23. doi:10.1007/s10493-019-00354-8.
- [20] Rivera-Páez FA, Martins TF, Ossa-López PA, Sampieri BR, Camargo-Mathias MI. Detection of *Rickettsia* spp. in ticks (Acari: Ixodidae) of domestic animals in Colombia. *Ticks Tick Borne Dis* 2018;9:819–23.
- [21] Barros-Battesti D, Arzua M, Bechara GH. Carrapatos de Importância Médico-Veterinária da Região Neotropical: Um Guia Ilustrado para Identificação de Espécies. Sao Paulo: Vox/ICTTD-3/ Butantan; 2006.

- [22] Martins TF, Onofrio VC, Barros-Battesti DM, Labruna MB. Nymphs of the genus *Amblyomma* (Acari: Ixodidae) of Brazil: descriptions, redescrptions, and identification key. *Ticks Tick Borne Dis* 2010;1:75–99.
- [23] Vargas M. Clave para los géneros más comunes de larvas de Ixodida (Acari: ixodidae). *Agron Costarric* 2006;30:101–5.
- [24] Londoño AF, Acevedo-Gutiérrez LY, Marín D, Contreras V, Díaz FJ, Valbuena G, et al. Wild and domestic animals likely involved in rickettsial endemic zones of Northwestern Colombia. *Ticks Tick Borne Dis* 2017;8:887–94. doi:10.1016/j.ttbdis.2017.07.007.
- [25] Sangioni LA, Horta MC, Vianna MC, Gennari SM, Soares RM, Galvao MA, et al. Rickettsial infection in animals and Brazilian spotted fever endemicity. *Emerg Infect Dis* 2005;11:265–70. doi:10.3201/eid1102.040656.
- [26] Oteo JA, Nava S, Sousa R de, Mattar S, Venzal JM, Abarca K, et al. Guías Latinoamericanas de la RIICER para el diagnóstico de las rickettsiosis transmitidas por garrapatas. *Rev Chil Infectología* 2014;31:54–65.
- [27] Labruna MB, Whitworth T, Horta MC, Bouyer DH, McBride JW, Pinter A, et al. *Rickettsia* species infecting *Amblyomma cooperi* ticks from an area in the state of Sao Paulo, Brazil, where Brazilian spotted fever is endemic. *J Clin Microbiol* 2004;42:90–8.
- [28] Sakai RK, Costa FB, Ueno TEH, Ramirez DG, Soares JF, Fonseca AH, et al. Experimental infection with *Rickettsia rickettsii* in an *Amblyomma dubitatum* tick colony, naturally infected by *Rickettsia bellii*. *Ticks Tick Borne Dis* 2014;5:917–23. doi:10.1016/j.ttbdis.2014.07.003.
- [29] Pacheco R, Rosa S, Richtzenhain L, Szabo MPJ, Labruna MB. Isolation of *Rickettsia bellii* from *Amblyomma ovale* and *Amblyomma incisum* ticks from Southern Brazil. *Rev MVZ Cordoba* 2008;13:1273–9.
- [30] Black WC, Piesman J. Phylogeny of hard-and soft-tick taxa (Acari: Ixodida) based on mitochondrial 16S rDNA sequences. *Proc Natl Acad Sci* 1994;91:10034–8.
- [31] Beati L, Keirans JE. Analysis of the systematic relationships among ticks of the genera *Rhipicephalus* and *Boophilus* (Acari: Ixodidae) based on mitochondrial 12S ribosomal DNA gene sequences and morphological characters. *J Parasitol* 2001;87. doi:10.1645/0022-3395(2001)087[0032:AOTSRA]2.0.CO;2.

- [32] Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA, Lane DJ. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J Bacteriol* 1991;173:697–703.
- [33] Márquez FJ, Muniain MA, Soriguer RC, Izquierdo G, Rodríguez-Baño J, Borobio MV. Genotypic identification of an undescribed spotted fever group rickettsia in *Ixodes ricinus* from southwestern Spain. *Am J Trop Med Hyg* 1998;58:570–7.
- [34] Guedes E, Leite RC, Prata MCA, Pacheco RC, Walker DH, Labruna MB. Detection of *Rickettsia rickettsii* in the tick *Amblyomma cajennense* in a new Brazilian spotted fever-endemic area in the state of Minas Gerais 2005;100:841–5.
- [35] Kollars TM, Kengluocha A. Spotted fever group *Rickettsia* in *Dermacentor variabilis* (Acari: Ixodidae) infesting raccoons (Carnivora: Procyonidae) and opossums (Marsupialia: Didelphimorphidae) in Tennessee. *J Med Entomol* 2001;38:601–2.
- [36] Regnery RL, Spruill CL, Plikaytis BD. Genotypic identification of rickettsiae and estimation of intraspecies sequence divergence for portions of two rickettsial genes. *J Bacteriol* 1991;173:1576–89.
- [37] Roux V, Raoult D. Phylogenetic analysis of members of the genus *Rickettsia* using the gene encoding the outer-membrane protein rOmpB (ompB). *Int J Syst Evol Microbiol* 2000;50:1449–55.
- [38] Choi Y-J, Jang W-J, Kim J-H, Ryu J-S, Lee S-H, Park K-H, et al. Spotted fever group and typhus group rickettsioses in humans, South Korea. *Emerg Infect Dis* 2005;11:237.
- [39] Regnery RL, Spruill CL, Plikaytis BD. Genotypic identification of rickettsiae and estimation of intraspecies sequence divergence for portions of two rickettsial genes. *J Bacteriol* 1991;173:1576–89.
- [40] Roux V, Fournier P-E, Raoult D. Differentiation of spotted fever group rickettsiae by sequencing and analysis of restriction fragment length polymorphism of PCR-amplified DNA of the gene encoding the protein rOmpA. *J Clin Microbiol* 1996;34:2058–65.
- [41] Sekeyova Z, Roux V, Raoult D. Phylogeny of *Rickettsia* spp. inferred by comparing sequences of 'gene D', which encodes an intracytoplasmic protein. *Int J Syst Evol Microbiol* 2001;51:1353–60.
- [42] Webb L, Carl M, Malloy DC, Dasch GA, Azad AF. Detection of murine typhus infection in fleas by using the polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1990;28:530–4.

- [43] Johnson M, Zaretskaya I, Raytselis Y, Merezhuk Y, McGinnis S, Madden TL. NCBI BLAST: a better web interface. *Nucleic Acids Res* 2008;36:W5–9.
- [44] Fournier PE, Raoult D. Current knowledge on phylogeny and taxonomy of rickettsia spp. *Ann N Y Acad Sci* 2009;1166:1–11. doi:10.1111/j.1749-6632.2009.04528.x.
- [45] Zeringóta V, Maturano R, Luz HR, Senra TOS, Daemon E, Faccini JLH, et al. Molecular detection of *Rickettsia rhipicephali* and other spotted fever group *Rickettsia* species in *Amblyomma* ticks infesting wild birds in the state of Minas Gerais, Brazil. *Ticks Tick Borne Dis* 2017;8:81–9.
- [46] Labruna MB. Ecology of *Rickettsia* in South America 2009;166:156–66. doi:10.1111/j.1749-6632.2009.04516.x.
- [47] Amorim Filho, E. F., Costa, F. B., Moraes-Filho, J., Santos, A. C. G. D., Vale, T. L. D., Costa, A. P. D., et al. Exposure of Baixadeiro horses to *Rickettsia* spp. and to ticks infected by *Rickettsia amblyommatis* in the Baixada Maranhense micro-region, Maranhão, Brazil. *Ciência Rural*, 2018; 48(9).
- [48] Merino, O., De la Cruz, N. I., Martinez, J., de León, A. P., Romero-Salas, D., Esteve-Gassent, M. D., & Lagunes-Quintanilla, R. Molecular detection of *Rickettsia* species in ticks collected in the Mexico-USA transboundary region. *Experimental and Applied Acarology*, 2020;1-9.
- [49] Beati L, Nava S, Burkman EJ, Barros-Battesti DM, Labruna MB, Guglielmone A A, et al. *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae), the Cayenne tick: phylogeography and evidence for allopatric speciation. *BMC Evol Biol* 2013;13:267. doi:10.1186/1471-2148-13-267.
- [50] Acevedo-Gutiérrez LY, Parra-Henao G, Paternina LE, Londoño AF, Rodas JD. Modelos potenciales de distribución geográfica y climática del complejo *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae), potencial vector de *Rickettsia rickettsii* en Colombia. *Biomédica* 2018;38:534–44. doi:10.7705/biomedica.v38i4.3916.
- [51] Estrada-Peña A, Guglielmone AA, Mangold AJ. The distribution and ecological “preferences” of the tick *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae), an ectoparasite of humans and other mammals in the Americas. *Ann Trop Med Parasitol* 2004;98:283–92. doi:10.1179/000349804225003316.

- [52] Contreras V, Londoño AF, Miranda J, Mattar S, Acevedo-Gutiérrez LY, Díaz FJ, et al. Infection by *Rickettsia felis* in *Ctenocephalides felis felis* Fleas from North of Colombia. *J Arthropod Borne Dis* 2019.
- [53] Hidalgo M, Montoya V, Martínez A, Mercado M, De la Ossa A, Vélez C, et al. Flea-borne rickettsioses in the north of Caldas province, Colombia. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2013;13:289–94. doi:10.1089/vbz.2012.1173.
- [54] Labruna MB, Walker DH. *Rickettsia felis* and changing paradigms about pathogenic rickettsiae. *Emerg Infect Dis* 2014;20:1768.
- [55] Tyrrell, JD, Qurollo, B. A., Tornquist, S. J., Schlaich, K. G., Kelsey, J, Chandrashekar, R et al. Molecular identification of vector-borne organisms in Ehrlichia seropositive Nicaraguan horses and first report of *Rickettsia felis* infection in the horse. *Acta tropica*, 2019;200:105170.
- [56] Sánchez Lerma L, Contreras Cogollo V, Mattar Velilla S, Rodríguez González I, Molina Atehortua AD, Castro Peñuela DF. Primera detección de Candidatus *Rickettsia colombianensi* en el departamento del Meta, Colombia . *Rev Habanera Ciencias Médicas* 2019;18:487–99.
- [57] Rivera-Páez FA, Labruna MB, Martins TF, Perez JE, Castaño-Villa GJ, Ossa-López PA, et al. Contributions to the knowledge of hard ticks (Acari: Ixodidae) in Colombia. *Ticks Tick Borne Dis* 2018;9:57–66. doi:https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2017.10.008.
- [58] Sánchez-Montes S, Isaak-Delgado AB, Guzmán-Cornejo C, Rendón-Franco E, Muñoz-García CI, Bermúdez S, et al. *Rickettsia* species in ticks that parasitize amphibians and reptiles: Novel report from Mexico and review of the worldwide record. *Ticks Tick Borne Dis* 2019.
- [59] Ogrzewalska M, Machado C, Rozental T, Forneas D, Cunha Le, De Lemos Ers. Microorganisms in the ticks *Amblyomma dissimile* Koch 1844 and *Amblyomma rotundatum* Koch 1844 collected from snakes in Brazil. *Med Vet Entomol* 2019;33:154–61.
- [60] Philip RN, Casper EA, Burgdorfer W, Gerloff RK, Hughes LE, Bell EJ. Serologic typing of rickettsiae of the spotted fever group by microimmunofluorescence. *J Immunol* 1978;121:1961–8.
- [61] Krawczak F, Borges, Heytor HG Caragelasco DS, Souza BM, Serpa MC, Lucas SR, Labruna MB. *Rickettsia bellii* could generate protection against a second infection by

Rickettsia rickettsii? VI CLER I Encuentro Ecol. y Control Ectoparásitos, Rev Colomb Cienc Pecu; 2017, p. 1.

[62] Hajduskova E, Literak I, Papousek I, Costa FB, Novakova M, Labruna MB, et al. 'Candidatus *Rickettsia mendelii*', a novel basal group rickettsia detected in *Ixodes ricinus* ticks in the Czech Republic. *Ticks Tick Borne Dis* 2016;7:482–6.

[63] Minichová L, Hamšíková Z, Mahríková L, Slovák M, Kocianová E, Kazimírová M, et al. Molecular evidence of *Rickettsia* spp. in ixodid ticks and rodents in suburban, natural and rural habitats in Slovakia. *Parasit Vectors* 2017;10:158.

[64] Rogovskyy A, Batool M, Gillis DC, Holman PJ, Nebogatkin I V, Rogovska Y V, et al. Diversity of *Borrelia* spirochetes and other zoonotic agents in ticks from Kyiv, Ukraine. *Ticks Tick Borne Dis* 2018;9:404–9.

[65] Stańczak J, Biernat B, Racewicz M, Zalewska M, Matyjasek A. Prevalence of different *Rickettsia* spp. in *Ixodes ricinus* and *Dermacentor reticulatus* ticks (Acari: Ixodidae) in north-eastern Poland. *Ticks Tick Borne Dis* 2018;9:427–34.

[66] Matei IA, Kalmár Z, Lupșe M, D'Amico G, Ionică AM, Dumitrache MO, et al. The risk of exposure to rickettsial infections and human granulocytic anaplasmosis associated with *Ixodes ricinus* tick bites in humans in Romania: a multiannual study. *Ticks Tick Borne Dis* 2017;8:375–8.

[67] Cumbie AN, Walters EL, Gaff HD, Hynes WL. First report of *Candidatus Rickettsia mendelii* in *Ixodes brunneus* from the United States. *Ticks Tick Borne Dis* 2019:101309.

[68] Preto O. Rickettsiosis in the Americas Paho / Who Experts Consultation on Final Report 2004.

[90] Najafov A, Hoxhaj G. Chapter 4 - Optimization and Troubleshooting. In: Najafov A, Hoxhaj GBT-PCRG, editors., Academic Press; 2017, p. 31–43. doi:<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804231-1.00004-3>.

[70] Quintero JC, Paternina LE, Uribe A, Muskus C, Hidalgo M, Gil J, et al. Eco-epidemiological analysis of rickettsial seropositivity in rural areas of Colombia: A multilevel approach. *PLoS Negl Trop Dis* 2017;11:19. doi:10.1371/journal.pntd.0005892.

Capítulo 4.

Presencia de dos especies del complejo *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae), potenciales vectores de *Rickettsia rickettsii* y posibles zonas de simpatría en el noroeste de Colombia

Resumen

Especies del complejo de garrapatas *Amblyomma cajennense* se ha considerado el vector principal de *Rickettsia rickettsii* en América Central y del Sur. Los estudios en Colombia han determinado la presencia de las especies *Amblyomma patinoi* y *Amblyomma mixtum* del complejo *A. cajennense* en las regiones Andina, Caribeña y Orinoquía; pero se desconoce las especies de este complejo que circulan en el noroeste de Colombia. Por esta razón, se propuso como objetivo identificar las especies del complejo *A. cajennense* que circulan en esta área.

Se realizó un estudio descriptivo en el cual se tomaron muestras de garrapatas de *A. cajennense* sensu lato infestando équidos del noroeste de Colombia. Las garrapatas hembra fueron identificadas de acuerdo a la morfología de su poro genital y se seleccionaron algunas para confirmación genética. Se recogieron muestras de cada municipio de origen del équido para realizar la extracción de ADN y posterior amplificación y secuenciación del gen *12S rRNA*. Las secuencias fueron sometidas a un análisis genético.

Se analizaron especímenes de 23 municipios en el noroeste del país. Morfológicamente se identificaron 65 especímenes como *A. patinoi* y 5 especímenes como *A. mixtum*, los cuales se confirmaron por pruebas moleculares. En el análisis se evidencia la circulación de *A. mixtum* y *A. patinoi* en diferentes municipios y la co-circulación de ambas especies en Lórica (Córdoba) y Morales (Bolívar).

En el noroeste del país se produce la circulación simultánea de las especies *A. patinoi* y *A. mixtum*. La distribución simpátrica de estas dos especies en algunos municipios de la región del Caribe podría tener efectos en la epidemiología de la rickettsiosis en esa región.

Palabras claves

Complejo *Amblyomma cajennense*, garrapatas, taxonomía, pruebas moleculares, filogenética

Introducción

En años recientes la garrapata dura neotropical *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) fue revisada y reclasificada como un complejo de seis diferentes especies basado en características biológicas, genéticas, reproductivas y morfológicas diferenciables. Las especies que componen este complejo son: *Amblyomma mixtum* Koch 1844 que se encuentra en el sur de Estados Unidos, México, Costa Rica, Panamá, Colombia y Ecuador; *Amblyomma patinoi* Labruna, Nava and Beati, 2014 en Colombia; *Amblyomma interandinum* Beati, Nava and Cáceres, 2014 registrada en Perú; *Amblyomma cajennense* sensu stricto (Fabricius, 1787), con registros en Guyana Francesa, Venezuela y Brasil, *Amblyomma sculptum* Berlese, 1888, hallada en Brasil y Argentina; y *Amblyomma tonelliae* Nava, Beati and Labruna, 2014 reportada en Argentina y Paraguay [1–4].

Estas especies de garrapatas son importantes debido a sus efectos por infestación en animales especialmente en *Equus caballus* y *Equus asinus*, así como en sus híbridos (mulas); aunque también se ha reportado en cerca de 44 hospederos entre animales silvestres y animales domésticos, incluyendo el hombre [5]. Adicionalmente estas garrapatas se han involucrado como principal vector en Latinoamérica de *Rickettsia rickettsii*, bacteria causal de Fiebre Manchada de las Montañas Rocosas (FMMR) en Estados Unidos, Fiebre de Tobia en Colombia o Fiebre Maculosa Brasileña en Brasil [6].

En Colombia la presencia del complejo *A. cajennense* se ha reportado en más de 14 departamentos del país que van desde climas templado y cálidos, y en una gran variedad de hospederos [7]. A partir del año 2016, diversos trabajos han logrado discriminar las especies del complejo en Colombia, demostrando la circulación de al menos dos especies del complejo en el territorio nacional, *A. mixtum* en los departamentos del Caldas, Casanare, Magdalena y Meta, y *A. patinoi* en Cundinamarca y Cauca [8–12].

En el noroeste de Colombia la presencia del complejo es importante puesto que allí se han presentado brotes de FMMR con letalidades entre 24 y el 54%, en los cuales se han vinculado como potencial vector a especies del complejo *A. cajennense* [13]. Estos antecedentes, en conjunto con el pobre conocimiento de la distribución de las especies de este complejo en el país, y a pesar de que existen numerosos registros de la presencia de *A. cajennense* s.l. en diferentes departamentos de Colombia, nos motivó a realizar un estudio para determinar las especies del complejo *A. cajennense* que pudiesen estar presentes en el noroeste del país.

Metodología

Recolección de las garrapatas

Se realizó el muestreo de garrapatas sobre animales llevados a la Planta de Beneficio y Faenado de équidos “La Rinconada” en Rionegro, Antioquia, en el marco del macroproyecto “Equinos como centinelas de la circulación de *Rickettsia* en Colombia”. La recolección se realizó con un esfuerzo de muestreo de siete minutos por équido (*Equus asinus*, *Equus caballus* y *Equus asinus* x *Equus caballus*), dos minutos de los cuales fueron destinados a la zona de orejas, crin y cola, y los minutos restantes para la parte inferior del cuerpo del animal, con el fin de maximizar la probabilidad de encontrar ejemplares del complejo *A. cajennense*. Se tomaron datos de especie y probable procedencia del animal según la información depositada en las guías de movilización del Instituto Colombiano Agropecuario (ICA). Este proyecto cumplió con las pautas del Comité de Ética en Experimentación Animal de la Universidad de Antioquia, según lo registrado en el acta 72 de 2014.

Taxonomía tradicional

Las garrapatas recolectadas fueron llevadas al laboratorio Centauro en la Universidad de Antioquia donde fueron identificadas taxonómicamente utilizando las claves dicotómicas [14] y se seleccionaron aquellas garrapatas identificadas como hembras *A. cajennense* sensu lato (s.l). Los especímenes del complejo *A. cajennense* se conservaron en isopropanol y a -20°C hasta el momento de la extracción de ADN y procesamiento molecular. Se seleccionaron las hembras ya que las características morfológicas de sus poros genitales permiten la distinción entre las especies *A. patinoi* y *A. mixtum*. Los poros genitales de los especímenes fueron observados bajo estereomicroscopio Nikon SMZ645 con un aumento 20X y se clasificaron según las indicaciones morfológicas del trabajo de Nava et al, 2014 [2].

Análisis molecular

A las hembras previamente clasificadas de acuerdo a la forma de las valvas en el poro genital se les realizó extracción de ADN de la totalidad o de un fragmento del ejemplar dependiendo del tamaño del acarino. La extracción de ADN se realizó con el kit DNeasy Blood and Tissue (Qiagen, Chatsworth, CA, USA) y siguiendo las instrucciones del fabricante, con previa maceración individual de las garrapatas con nitrógeno líquido. Los extractos de ADN fueron usados en la amplificación de un fragmento del gen *12S rRNA* con los cebadores T1B (5'-AAA CTA GGA TTA GAT ACC CT-3') y T2B (3'-AAT GAG

AGC GAC GGG CGA TGT-3'), los cuales fueron utilizados en la discriminación de las especies del complejo y han sido empleados exitosamente en sistemática de la familia Ixodidae [15]. La amplificación fue realizada en un volumen de 25 μ L de reacción y utilizando TaqPlatinum DNA polymerase (Invitrogen), con las condiciones térmicas de amplificación: desnaturalización inicial a 94°C por 2 minutos, seguido de 35 ciclos de 94°C por 30 segundos, 53°C por 30 segundos, 72°C por 30 segundos, seguido por extensión final de 72°C por 7 minutos. Los productos de amplificación obtenidos fueron sometidos a secuenciación en la empresa Macrogen (Seoul, Corea del Sur).

Análisis genético

Los electroferogramas obtenidos fueron ensamblados como secuencias consenso por muestra, y luego las secuencias consenso se alinearon utilizando el algoritmo ClustalW junto con las secuencias originalmente reportadas por Beati et al., (2013) [1]. El alineamiento constó de 122 secuencias con 306 sitios, posteriormente se seleccionó el mejor modelo de sustitución nucleotídica de acuerdo al criterio AIC en el programa JModelTest 2.1.10 [16], con esta información se construyó el árbol de Máxima-Verosimilitud usando PhyML 3.1 [17] y finalmente el árbol fue editado en el módulo Tree Explorer 2.12. Adicionalmente se calculó una red de haplotipos utilizando el algoritmo de Recorrido Mínimo (Minimum Spanning Network) y finalmente se re-diagramó la red de haplotipos en la aplicación PopArt 1.7 [18,19].

Resultados

Se obtuvo un total de 70 hembras clasificadas previamente como *A. cajennense* s.l. de 23 municipios del noroeste del país y recolectadas en caballos, mulas y burros. Los municipios reportados en las guías de movilización se presentan en la Figura 4-1. Vale aclarar que en Colombia las guías de movilización tienen un grado de incertidumbre intrínseco respecto a la trazabilidad del origen de los animales, por lo cual los municipios serán tratados como “orígenes potenciales”.

Por observación del poro genital se identificaron 65 ejemplares con características de *A. patinoi* y cinco de *A. mixtum*, tal como se ilustran morfotipos de la apertura genital en la figura 4-2. Las garrapatas identificadas como *A. mixtum* estaban registradas en los potenciales municipios de Cáceres (n=2), Lórica (n=1), Urrao (n=1) y Morales (n=1). Los cinco individuos identificados como *A. mixtum* y 22 individuos identificados como *A. patinoi*, representativos de cada municipio fueron seleccionados para la secuenciación de ADN y análisis genético. En resumen, el análisis de similitud local BLASTn identificó las

garrapatas de igual forma que el análisis del poro genital, indicando una concordancia del 100% entre los hallazgos moleculares y el morfotipaje del poro genital.

En el análisis genético se observa que los especímenes de *A. mixtum* de Colombia se agrupan con secuencias del Sur de Estados Unidos/México y Costa Rica/Ecuador, mientras que las secuencias de ejemplares identificados de *A. patinoi* se agrupan con las secuencias previamente reportadas para esta especie en el país (Figura 4-3). Por otro lado, la red haplotípica presentó un límite de conexión de 7 mutaciones para diferenciar entre las especies del complejo y se lograron identificar cinco haplotipos totales, cuatro de *A. patinoi* y uno de *A. mixtum* (Figura 4-3). Las secuencias obtenidas se depositaron en el GenBank con los códigos MK457143 hasta MK457169.

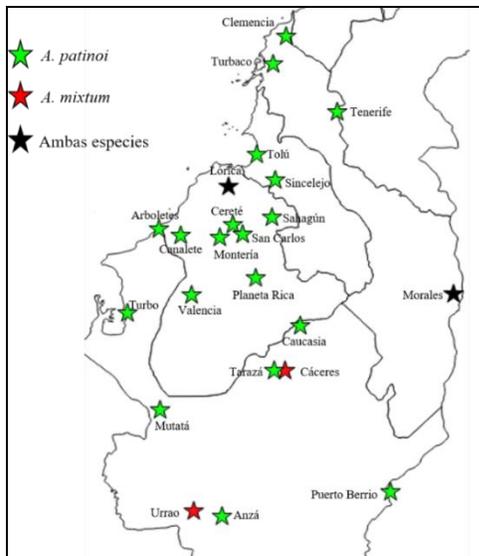
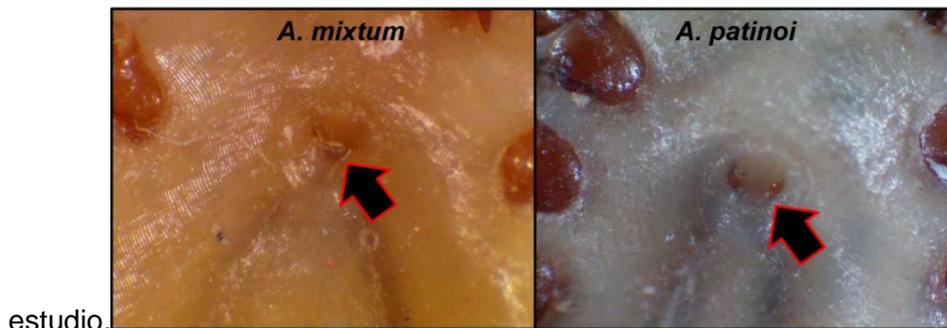


Figura 4-1. Mapa de distribución especies del complejo *A. cajennense* en la región de



estudio.

Figura 4-2. Apariencia de la apertura genital de dos hembras identificadas morfológicamente como *A. mixtum* y *A. patinoi* bajo estereo-microscopía a 20X. Nótese la forma y disposición de las valvas genitales.

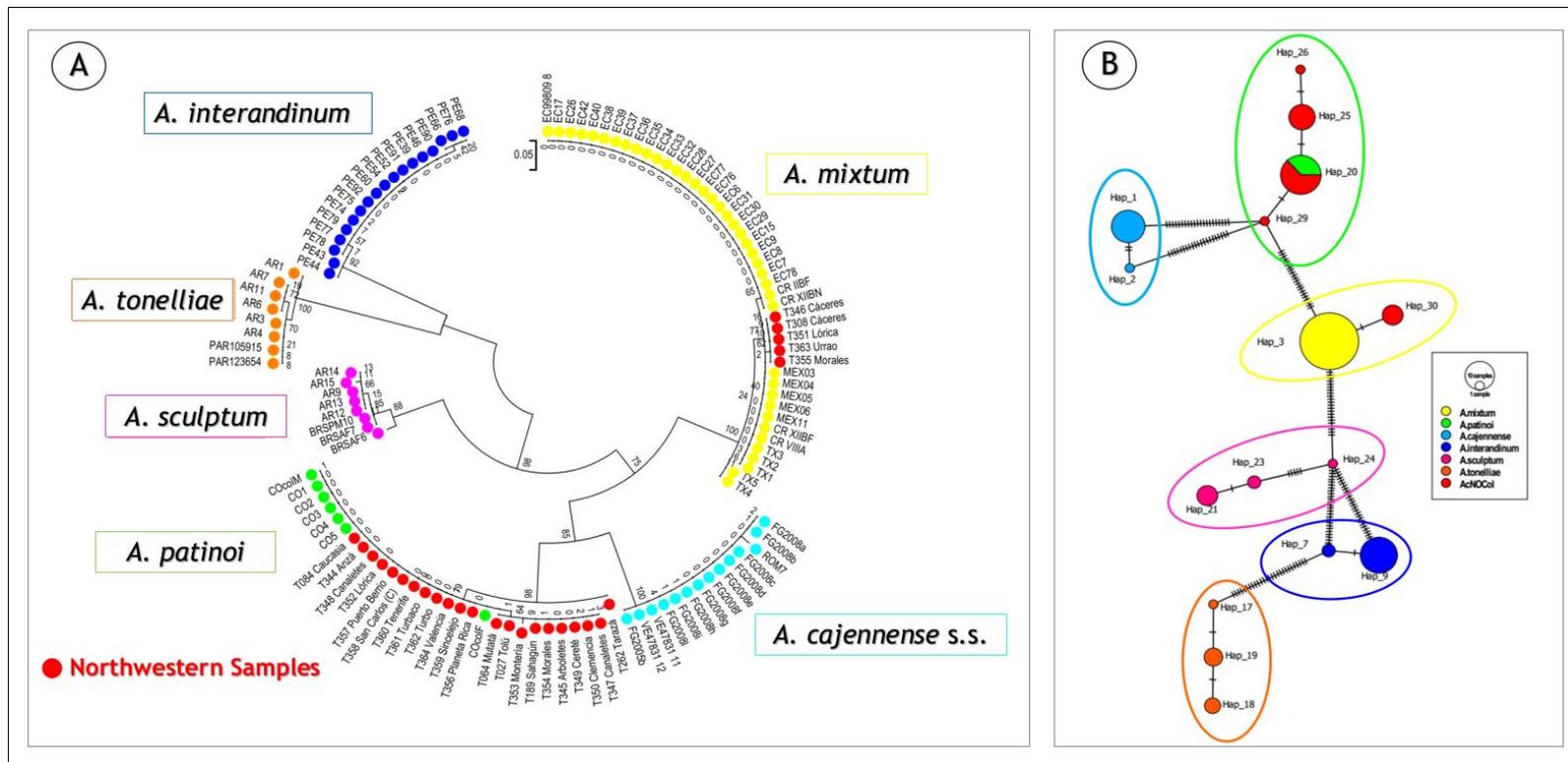


Figura 4-3. A) Árbol filogenético Máxima Verosimilitud del gen *12S rRNA* con soporte aBayes (probabilidades presentadas como porcentajes de 0 a 100) y utilizando el Modelo TPM2uf+I para 296 sitios analizables en el programa PhyML 3.1. B) Red haplotípica MSN del gen *12S rRNA* ilustrando la riqueza y abundancia haplotípica observada a partir de las muestras recolectadas. En rojo se presentan las secuencias obtenidas a partir del presente trabajo donde se indica el código interno utilizado y la localidad probable de origen de acuerdo a las guías de movilización de animales (filograma), códigos de colores similares fueron usados para el árbol y la red haplotípica.

Discusión

La distribución histórica del complejo *A. cajennense* en Colombia es bastante amplia [7], solo recientemente se ha reconocido la presencia de *A. patinoi* en una zona restringida del Valle del Río Magdalena en Cundinamarca y se asumía la probable presencia de *A. mixtum* en el Caribe Colombiano dados los rangos de distribución inicialmente descritos para estas especies [1,2]. Sin embargo, trabajos recientes señalan que la distribución de estas dos especies de garrapatas es mucho más amplia de lo inicialmente planteado [8,9,11], situación que podría deberse a los rasgos comunes de preferencia del hábitat climático que exhiben las garrapatas de este complejo en Colombia [7] y por supuesto, a una alta movilidad de équidos infestados por diferentes especies de garrapatas del complejo *A. cajennense* entre las eco-regiones colombianas.

En el país, las garrapatas *A. patinoi* y *A. mixtum* se habían reportado previamente en los departamentos de la región andina y región de la Orinoquía [9-10], pero la presencia de ambas especies en la región Caribe evidencia que la distribución se extiende a un espacio más amplio, lo cual refleja la amplitud en buena medida de su selección del hábitat y se corresponde con estudios previos de modelación de nicho grinelliano para garrapatas del complejo en el país [7].

Se ha sugerido que el complejo tiene una distribución alopátrica, pero la presencia de ambas especies en équidos del mismo municipio sugiere que potencialmente *A. mixtum* y *A. patinoi* pueden tener una distribución simpátrica [1]. Estudios previos para otras especies del complejo, han sugerido procesos de simpatría entre *A. sculptum* y *A. tonelliae*, y *A. sculptum* y *A. cajennense* sensu stricto, indicando que las especies del complejo pueden solaparse en zonas de transición [20]. La probabilidad que ambas especies circulen en la misma región puede sugerirnos que en estos municipios pueden ocurrir procesos de hibridación, como previamente se han reportado en otras especies de garrapatas en Norteamérica y Asia, pero se requiere la implementación de genes nucleares y otras técnicas para comprobar esta hipótesis [21,22]

Tanto *A. patinoi* como *A. mixtum* se han vinculado como potenciales vectores de especies de *Rickettsia*, siendo una de las más importantes *R. rickettsii*, aunque también se han reportado otras especies con incluso altas frecuencias de infección natural, como ejemplo tenemos a *A. mixtum* que se ha encontrado con unas frecuencias entre el 25 y 50% de infección por *Rickettsia amblyommatis* en Panamá [10,23,24]. El hallazgo de diversas especies *Rickettsia* y de garrapatas en una región donde previamente se han reportado

casos de rickettsiosis, pueden tener un impacto sobre la epidemiología de la enfermedad en la zona, dado que se ha propuesto que infecciones previas con especies de virulencia media o baja pueden generar protección cruzada frente a infecciones de especies con alta virulencia [19]. Este tipo de procesos podrían estar dándose en zonas de alta seropositividad y casos esporádicos de FMMR, como sucede hasta el momento en el noroeste de Colombia [25,26].

Respecto a los haplotipos para el gen *12S rRNA* se pudieron detectar cuatro para *A. patinoi* y uno para *A. mixtum*. Estudios previos para *A. patinoi* con especímenes del departamento de Cundinamarca y para el mismo gen presentaron 2 haplotipos, pese a provenir de un solo departamento. Para el caso de *A. mixtum* detectamos menor variación genética dado que estudios previos habían demostrado 9 haplotipos de secuencias de Estados Unidos, México, Costa Rica y Ecuador [1]. Nuestros resultados parecen mostrar mayor y menor riqueza haplotípica para *A. patinoi* y *A. mixtum*; esto es llamativo, especialmente para esta última especie, debido a la distancia geográfica que existe entre las localidades de donde provienen nuestras muestras, que incluyeron cinco departamentos. Este fenómeno puede deberse precisamente a la naturaleza de este estudio que fue de carácter descriptivo, por lo cual se presentaron limitaciones en la inclusión de un rango limitado de hospederos (caballos, burros y mulas) que podrían superarse con el muestreo en una mayor variedad que incluyan animales silvestres, y visitas a otras zonas geográficas con condiciones ecológicas diferentes [27].

Nuestros resultados demuestran la circulación en équidos de *A. patinoi* y *A. mixtum* en el noroeste de Colombia utilizando técnicas de taxonomía clásicas y moleculares, con estos resultados ampliamos nuestro conocimiento acerca de la distribución de las garrapatas del complejo *A. cajennense* desde el enfoque de “Una Salud” con un importante impacto a nivel de salud humana y veterinaria.

Referencias

- [1] Beati L, Barros-Battesti DM, Cáceres AG, Guglielmone AA, Labruna MB, Durden LA, et al. *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae), the Cayenne tick: phylogeography and evidence for allopatric speciation. *BMC Evol Biol* 2013;13:267. doi:10.1186/1471-2148-13-267.
- [2] Nava S, Beati L, Labruna MB, Cáceres AG, Mangold AJ, Guglielmone AA.

- Reassessment of the taxonomic status of *Amblyomma cajennense* () with the description of three new species, *Amblyomma tonelliae* n. sp., *Amblyomma interandinum* n. sp. and *Amblyomma patinoi* n. sp., and reinstatement of *Amblyomma mixtum*, and *Amblyomma sculptu*. *Ticks Tick Borne Dis* 2014;5:252-76. doi:10.1016/j.ttbdis.2013.11.004.
- [3] Mastropaolo M, Nava S, Guglielmone AA, Mangold AJ. Biological differences between two allopatric populations of *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae) in Argentina. *Exp Appl Acarol* 2011;53:371-5. doi:10.1007/s10493-010-9404-6.
- [4] Labruna, M.B., Soares, J.F., Martins, T.F., Soares, H.S., Cabrera, R.R., 2011. Cross-mating experiments with geographically different populations of *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae). *Exp. Appl. Acarol.* 54, 41–49.
- [5] Nava S, Guglielmone AA. A meta-analysis of host specificity in Neotropical hard ticks (Acari: Ixodidae). *Bull Entomol Res* 2013;103:216-24. doi:10.1017/s0007485312000557.
- [6] Dantas-Torres F. Rocky Mountain spotted fever. *Lancet Infect Dis* 2007;7:724-32. doi:S1473-3099(07)70261-X [pii] 10.1016/S1473-3099(07)70261-X.
- [7] Acevedo-Gutiérrez LY, Parra-Henao G, Paternina LE, Londoño AF, Rodas JD. Modelos potenciales de distribución geográfica y climática del complejo *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae), potencial vector de *Rickettsia rickettsii* en Colombia. *Biomédica* 2018;38:534-44. doi:10.7705/biomedica.v38i4.3916.
- [8] Rivera-Páez FA, Labruna MB, Martins TF, Perez JE, Castaño-Villa GJ, Ossa-López PA, et al. Contributions to the knowledge of hard ticks (Acari: Ixodidae) in Colombia. *Ticks Tick Borne Dis* 2018;9:57-66. doi:https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2017.10.008.
- [9] Rivera-Páez FA, Labruna MB, Martins TF, Sampieri BR, Camargo-Mathias MI. *Amblyomma mixtum* Koch, 1844 (Acari: Ixodidae): First record confirmation in Colombia using morphological and molecular analyses. *Ticks Tick Borne Dis*

2016;7:842-8. doi:10.1016/j.ttbdis.2016.03.020.

- [10] Faccini-Martínez A, Costa F, Hayama-Ueno T, Ramírez-Hernández A, Cortés-Vecino J, Labruna M, et al. *Rickettsia rickettsii* in *Amblyomma patinoi* Ticks, Colombia. *Emerg Infect Dis* 2015;21:537-9. doi:10.3201/eid2013.140721.
- [11] Peña-R, Y., Olaya, L.A., Hidalgo, M., 2015. Estudio serológico y entomológico de Rickettsiosis en dos municipios del departamento del Cauca—Colombia: La Sierra y Rosas/2013-2014. *Rev. Biomédica Uady* 26, 55–56.
- [12] Santodomingo, A., Sierra-Orozco, K., Cotes-Perdomo, A., Castro, L.R., 2019. Molecular detection of *Rickettsia* spp., *Anaplasma platys* and *Theileria equi* in ticks collected from horses in Tayrona National Park, Colombia. *Exp. Appl. Acarol.* 77, 411–423.
- [13] Pacheco O, Giraldo M, Martinez M, Hidalgo M, Galeano A, Echeverri E, et al. Estudio de brote febril hemorrágico en el corregimiento de Alto de Mulatos - Distrito Especial Portuario de Turbo, Antioquia, enero de 2008. *Inf Quinc Epidemiol Nac* 2008;13:145-60.
- [14] Barros-Battesti D, Arzua M, Bechara GH. Carrapatos de Importância Médico-Veterinaria da Região Neotropical: Um Guia Ilustrado para Identificação de Espécies. Sao Pablo: Vox/ICTTD-3/ Butantan; 2006.
- [15] Beati L, Keirans JE. Analysis of the systematic relationships among ticks of the genera *Rhipicephalus* and *Boophilus* (Acari: Ixodidae) based on mitochondrial 12S ribosomal DNA gene sequences and morphological characters. *J Parasitol* 2001;87. doi:10.1645/0022-3395(2001)087[0032:AOTSRA]2.0.CO;2.
- [16] Darriba, D., Taboada, G.L., Doallo, R., Posada, D., 2012. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nat. Methods* 9, 772.
- [17] Guindon, S., Dufayard, J.-F., Lefort, V., Anisimova, M., Hordijk, W., Gascuel, O., 2010. New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies:

- assessing the performance of PhyML 3.0. *Syst. Biol.* 59, 307–321.
- [18] Bandelt, H.J., Forster, P., Röhl, A., 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Mol. Biol. Evol.* 16, 37–48.
- [19] Leigh, J.W., Bryant, D., 2015. Popart: full-feature software for haplotype network construction. *Methods Ecol. Evol.* 6, 1110–1116.
- [20] Estrada-Peña A, Tarragona EL, Vesco U, Meneghi D, Mastropaolo M, Mangold AJ, et al. Divergent environmental preferences and areas of sympatry of tick species in the *Amblyomma cajennense* complex (Ixodidae). *Int J Parasitol* 2014;44:1081-9. doi:10.1016/j.ijpara.2014.08.007.
- [21] Martins TF, Barbieri ARM, Costa FB, Terassini FA, Camargo LMA, Peterka CRL, et al. Geographical distribution of *Amblyomma cajennense* (sensu lato) ticks (Parasitiformes: Ixodidae) in Brazil, with description of the nymph of *A. cajennense* (sensu stricto). *Parasites and Vectors* 2016;9:1-14. doi:10.1186/s13071-016-1460-2.
- [21] Araya-Anchetta A, Scoles GA, Giles J, Busch JD, Wagner DM. Hybridization in natural sympatric populations of *Dermacentor* ticks in northwestern North America. *Ecol Evol* 2013. doi:10.1002/ece3.496.
- [22] Kovalev SY, Mikhaylishcheva MS, Mukhacheva TA. Natural hybridization of the ticks *Ixodes persulcatus* and *Ixodes pavlovskyi* in their sympatric populations in Western Siberia. *Infect Genet Evol* 2015. doi:10.1016/j.meegid.2015.04.003.
- [23] Castro AM, García GG, Dzul-Rosado K, Aguilar A, Castillo J, Gabster A, et al. Questing *Amblyomma mixtum* and *Haemaphysalis juxtakochi* (Acari: Ixodidae) Infected with *Candidatus "Rickettsia amblyommii"* from the Natural Environment in Panama Canal Basin, Panama. *Trop Med Health* 2015;43:217-22. doi:10.2149/tmh.2015-07.
- [24] Troyo A, Moreira-Soto RD, Calderon-Arguedas Ó, Mata-Somarribas C, Ortiz-Tello J, Barbieri ARM, et al. Detection of rickettsiae in fleas and ticks from areas of Costa

Rica with history of spotted fever group rickettsioses. *Ticks Tick Borne Dis* 2016. doi:10.1016/j.ttbdis.2016.08.009.

[25] Rivas JJ, Moreira-Soto A, Alvarado G, Taylor L, Calderón-Arguedas O, Hun L, et al. Pathogenic potential of a Costa Rican strain of «*Candidatus Rickettsia amblyommii*» in guinea pigs (*Cavia porcellus*) and protective immunity against *Rickettsia rickettsii*. *Ticks Tick Borne Dis* 2015. doi:10.1016/j.ttbdis.2015.07.008.

[26] Dahlgren F, Paddock CD, Springer YP, Eisen RJ, Behravesh CB. Expanding range of *Amblyomma americanum* and simultaneous changes in the epidemiology of spotted fever group rickettsiosis in the United States. *Am J Trop Med Hyg* 2016;94:35-42. doi:10.4269/ajtmh.15-0580.

[27] Bitencourth K, Voloch CM, Serra-Freire NM, Machado-Ferreira E, Amorim M, Gazêta GS. Analysis of *Amblyomma sculptum* haplotypes in an area endemic for Brazilian spotted fever. *Med Vet Entomol* 2016. doi:10.1111/mve.12174.

Capítulo 5.

Propuesta de potenciales áreas de circulación de *Rickettsia* spp. en el noroeste de Colombia a partir del uso de équidos como centinelas

Resumen

Las rickettsiosis causadas por bacterias transmitidas por garrapatas son enfermedades zoonóticas desatendidas. En los últimos años en Colombia se ha obtenido evidencia de la circulación de rickettsias con casos y brotes humanos en áreas restringidas del noroeste de Colombia, pero se sospecha que la distribución es más amplia. Por esta razón se tiene como objetivo establecer potenciales zonas de riesgo de rickettsiosis en el noroeste de Colombia empleando équidos como centinelas de la infección.

Se realizó un análisis de decisión multicriterio en un Sistema de Información Geográfico siguiendo diferentes pasos en los cuales se integró información serológica, molecular, acarológica y ecológica, derivada del macroproyecto. Se establecieron, normalizaron y asignaron criterios para el análisis y se construyeron mapas de riesgo potencial, los cual fue determinada su sensibilidad respecto a los casos previamente acontecidos en el área de estudio.

Los hallazgos sugieren áreas potenciales para *Rickettsia* spp. Los resultados indican que en el área de estudio existen áreas potenciales de riesgo de exposición a rickettsias transmitidas por garrapatas que infestan a los équidos, proponiéndose subregiones específicas con mayor probabilidad, entre las cuales sobresalen algunas de los departamentos de Antioquia, Córdoba y Sucre en zonas con condiciones ecológicas diferentes, pero se resaltan las zonas costeras, de sabana y de bosque húmedo tropical.

El uso del análisis de decisión multicriterio, Sistema de Información Geográfico y datos de los équidos como centinelas, permiten identificar que la distribución geográfica de *Rickettsia* spp. es potencialmente mayor a la descrita previamente en el país. Estas áreas son candidatas para estudios de vigilancia de la rickettsiosis en el noroeste de Colombia.

Introducción

Bajo el término rickettsiosis se agrupan una serie de enfermedades de distribución mundial, causadas por bacterias del género *Rickettsia*, las cuales pueden ser transmitidas por diversos artrópodos [1]. Las especies patógenas del género pueden infectar a los

humanos que inicialmente presentan una triada de dolor de cabeza, fiebre y erupción maculopapular o petequial, que puede acompañarse de escara en algunos casos. Posteriormente, pueden desarrollar una vasculitis en diversos órganos como el cerebro o los pulmones, que puede conllevar a complicaciones potencialmente mortales como edema pulmonar, neumonía intersticial, meningoencefalitis, coma, entre otras; que dependen de la ubicación del daño, el estado inmunológico del paciente, la especie o cepa de la bacteria, entre otras características, y que en el peor de los escenarios pueden conllevar a la muerte [2,3].

El diagnóstico de estas entidades es un reto a pesar de que existe un tratamiento efectivo como lo es la doxiciclina. El reto es debido a varios factores, tales como que los signos y síntomas no son patognomónicos y pueden presentarse en otras enfermedades más prevalentes como dengue y leptospirosis, que a su vez confluyen en las mismas áreas tropicales, el alto grado de desconocimiento del personal de salud sobre esta enfermedad, junto a su difícil diagnóstico y disponibilidades de pruebas en algunas zonas, entre otras razones que complican su diagnóstico y atención oportuna [3–5].

En el contexto nacional, la rickettsiosis asociada con Fiebre Manchada de las Montañas Rocosas (FMMR), se describió por primera vez hace más de 70 años en Tobia, Cundinamarca con reportes de letalidad del 95%, y posteriormente se han reportado casos en la región de Villeta, Cundinamarca en el siglo XXI (a partir del 2001) [6,7]. Se presentaron entre los años 2006 al 2008, tres brotes en las regiones del Urabá antioqueño y Córdoba, con letalidades entre el 26 y 54% [6,8–10]. Estos reportes con importantes casos en humanos abrieron el campo de investigaciones que han derivado en evidencia serológica de infección por *Rickettsia* en humanos en los departamentos de Cundinamarca, Meta, Córdoba, La Guajira, Cauca, entre otros departamentos [11–15]. Recientemente, se han reportado casos mortales en los municipios antioqueños de Chigorodó y Uramita, los cuales fueron previamente diagnosticados como dengue. El sitio de presentación en este último caso fue llamativo, ya que Uramita no se consideraba previamente esta zona como de probable exposición a la bacteria, lo cual indica que las regiones de circulación pueden ser más amplias de los previamente esperado [16,17].

La rickettsiosis es una enfermedad zoonótica reemergente y desatendida en el país, de la cual se conoce una limitada información de su eco-epidemiología. Asimismo, no se cuenta con un protocolo de notificación obligatoria, y no está categorizada como una enfermedad priorizada por parte del Ministerio de Salud y Protección Social de Colombia [18].

Estos vacíos en el conocimiento soportan la necesidad de explorar más elementos básicos de su eco-epidemiología, como es el caso de su distribución. Existen metodologías para esto, a través de vigilancia epidemiológica, pero al ser una enfermedad de la que existen datos limitados, se debe adaptar a vigilancias especializadas, como es el caso del uso de animales centinelas que junto con novedosas técnicas Sistema de Información Geográfico (SIG), pueden optimizar el uso de recursos en el estudio de la rickettsiosis.

Gracias a animales centinelas, como es el caso de los équidos para la rickettsiosis, se pueden recabar datos que pueden ser integrados a sistemas de análisis como el Análisis Multicriterio de Decisiones (AMCD), que se definen como una herramienta estructurada que permite la evaluación de alternativas basadas en criterios múltiples, posiblemente conflictivos o incluso inconmensurables en un problema de decisión [19]. Estos AMCD han sido usados en diferentes disciplinas como en ingenierías y economía, por ejemplo, y se ha detectado su capacidad de implementación en el estudio de enfermedades infecciosas, particularmente en las transmitidas por vectores, debido a que, al incorporar diferentes perspectivas, permite obtener un enfoque creíble, reconocido y realista para establecer prioridades basadas en pruebas, como por ejemplo en el estudio de potenciales zonas de riesgo [19,20].

Ante las necesidades expuestas y la disponibilidad de diferentes datos obtenidos en el macroproyecto, nos propusimos como objetivo establecer potenciales zonas de riesgo de rickettsiosis en el noroeste de Colombia empleando équidos como centinelas de la exposición con el propósito de generar un modelo que sirva como propuesta para estudios posterior en esa región del país.

Metodología

Área de estudio

Se realizó un estudio exploratorio donde según los departamentos de probable origen de los équidos muestreados en el macroproyecto, se estableció como área de estudio los departamentos de Antioquia, Córdoba, Sucre, Bolívar, Magdalena y Atlántico, los cuales corresponden a parte de la región del noroeste del país. Estos departamentos cubren una totalidad de 681537 km² y presentaban para el año 2018, según estimaciones del DANE (<https://www.dane.gov.co/index.php/estadisticas-por-tema/demografia->), una población de 15'372.907 de habitantes, lo cual corresponde al 31% de toda Colombia.

El clima en estos departamentos es tropical presentando amplia diversidad, debido a lo amplio de su superficie, orografía y sus diversos pisos térmicos. Antioquia presenta la mayor diversidad de climas que van desde clima cálido, templado y frío. Los demás departamentos presentan en climas cálidos y templados, siendo el clima cálido el más representativo de la región abordada (<https://www.todacolombia.com/departamentos-de-colombia/>).

Propuesta de mapa de riesgo

Se realizó un AMCD en un SIG siguiendo los pasos numerados a continuación: 1. Definir objetivo a partir del problema de investigación, 2. Definir partes interesadas, 3. Identificar las alternativas (determinantes), 4. Identificar los criterios, 5. Estandarizar los criterios, 6. Determinar el peso de los criterios, 7. Análisis de decisión y 8. Análisis de sensibilidad [19].

En nuestro caso el primer paso fue definido en el objetivo en la parte introductoria, para el segundo, las partes interesadas se definieron como la comunidad científica y tomadores de decisiones en salud pública. Para el tercer y cuarto paso, se seleccionaron cuatro determinantes principales, a) acaralógico, b) serológico c) molecular y d) ecológico, los cuales contienen 12 criterios que son presentados en la tabla 5-1. Estos criterios fueron tenidos en cuenta según los datos recolectados en el estudio y los derivados de su ubicación espacial a nivel de municipio probable de origen. Para obtener los datos de cada criterio por municipio, se utilizaron las capas de cada uno de los criterios en formato vectorial de donde se extrajeron los valores según cada uno de los municipios probables de origen de los équidos. Los procesos de SIG se realizaron en el software QGIS 3.0. Para el realizar el 5 punto se construyó, con los datos extraídos, una matriz donde se normalizaron los datos utilizando el método analítico de jerarquía donde considerando la fórmula 1 [21,22].

Ecuación 1.
$$valor\ normalizado = (valor - m\u00edimo) / (m\u00e1ximo - m\u00edimo).$$

En el sexto paso se les asignó un peso (0-100%) según criterios de los investigadores, donde se consideró un peso para cada uno de los determinantes. Los pesos asignados fueron para los determinantes acaralógicos del 30% debido a la importancia de la presencia del potencial vector en la zona, los serológicos del 40% porque nos demuestran la seropositividad de los animales y circulación de la bacteria en la zona, los moleculares del 20% debido a los porcentajes naturales de infección pueden variar y ser bajos para

especies de *Rickettsia* patógenas, y para los ecológicos del 10% teniendo en cuenta la escala del área de estudio. Los porcentajes de cada determinante se distribuyeron para cada criterio.

Para dar cumplimiento al paso siete se realizó una suma ponderada considerando los criterios y su respectivo porcentaje para obtener un puntaje final por cada municipio que indica la aptitud de cada municipio para presentar la circulación de bacterias del género *Rickettsia*. Para la suma ponderada se utilizó la fórmula 2, donde A_i es la aptitud de cada municipio, W_j es el peso asignado a cada criterio (1-100), X_{ij} es el valor del criterio estandarizado [23].

Ecuación 2.
$$A_i = \sum_{j=1}^J W_j * X_{ij}$$

El valor de aptitud sirvió como valor de peso para la construcción de un mapa de calor mapa de calor utilizando la estimación de la densidad del núcleo Kernel para un radio de 20Km².

Para finalizar, la sensibilidad del modelo se estimó a partir de los reportes de casos de enfermedad de rickettsiosis en humanos reconocidos en la zona, por técnicas serológicas (seroconversión), moleculares y clínicas. Los casos se buscaron en bases de datos de Pubmed, Google Scholar, comunicaciones oficiales y no oficiales, y datos del grupo Centauro sin publicar. La sensibilidad se calculó teniendo en cuenta el número de casos que se ubicaron en áreas con mediano y alto riesgo según los puntajes de los criterios. No se incluyeron los datos serológicos con única muestra debido a que únicamente indican exposición.

Tabla 5-1. Determinantes, criterios e indicadores usados para la construcción de AMCD

Determinantes	Criterio	Indicadores	Fuente
Acarológicos	Presencia de <i>A. cajennense</i> s.l.	Presencia Ausencia	Datos propios
	Nicho ecológicos Ac	Presencia Ausencia	Modelo de nicho ecológico [24]
	Presencia de garrapatas	Presencia Ausencia	Datos propios
	Numero de <i>A. cajennense</i> s.l.	Frecuencia absoluta	Datos propios
Serológicos	IFI	Positivo Negativo	Datos propios
	IFI GFM	Positivo Negativo	Datos propios
	APHIR RR	Total	Datos propios
	Porcentaje de positividad	Frecuencia relativa	Datos propios
	Conglomerado <i>R. rickettsii</i>	Presencia Ausencia	Datos propios

Identificación de potenciales áreas de riesgo de rickettsiosis en el noroeste de Colombia a través del uso de équidos como centinelas

	Conglomerado <i>Rickettsia</i> spp.	Presencia Ausencia	Datos propios
Molecular	PCR positiva	Positivo Negativo	Datos propios
	Porcentaje mínimo de infección por municipio	Frecuencia relativa	Datos propios
	PCR positiva para GFM	Positivo Negativo	Datos propios
Ecológico	Clima según Lang	Árido Desértico Húmedo Semiárido Semihúmedo Superhúmedo	http://www.siac.gov.co/
	Porcentaje de cambio bosque	Frecuencia relativa	http://www.siac.gov.co/

Resultados

En el proceso de integración de la información en el AMCD se identificaron valores de idoneidad en un rango de 32-82%. Los municipios de Turbo y Anzá del departamento de Antioquia, Montería, Canalete, Planeta Rica y San Carlos del departamento de Córdoba, y el municipio de Sincelejo del departamento de Sucre, presentaron mayor idoneidad para presentar rickettsiosis, con valores superiores a 58%. Por el contrario, los municipios de Ovejas, Tolú y Majagual de Sucre, Barranquilla en el departamento de Atlántico, municipio de Morales de Bolívar y San Carlos de Antioquia presentaron datos de idoneidad inferiores al 36% (Figura 5-1).

El mapa de calor permitió la extender la búsqueda del riesgo a otras regiones de donde no se tenían animales muestreados, indicándonos áreas probables de alto riesgo en toda la región costera del área de estudio. Las áreas con mayor riesgo se ubicaron en el noroeste del departamento de Sucre, casi todo el departamento de Córdoba y las subregiones de Urabá, Baja Cauca y Suroeste del departamento de Antioquia.

En el análisis de la sensibilidad del modelo, se encontraron diez sitios con reportes de casos de rickettsiosis (Tabla 5-1). Al ubicarlos en el mapa se encontraron que 10 de los 12 lugares de los casos se ubicaron en zonas de medio y alto riesgo, indicando una sensibilidad del 83%.

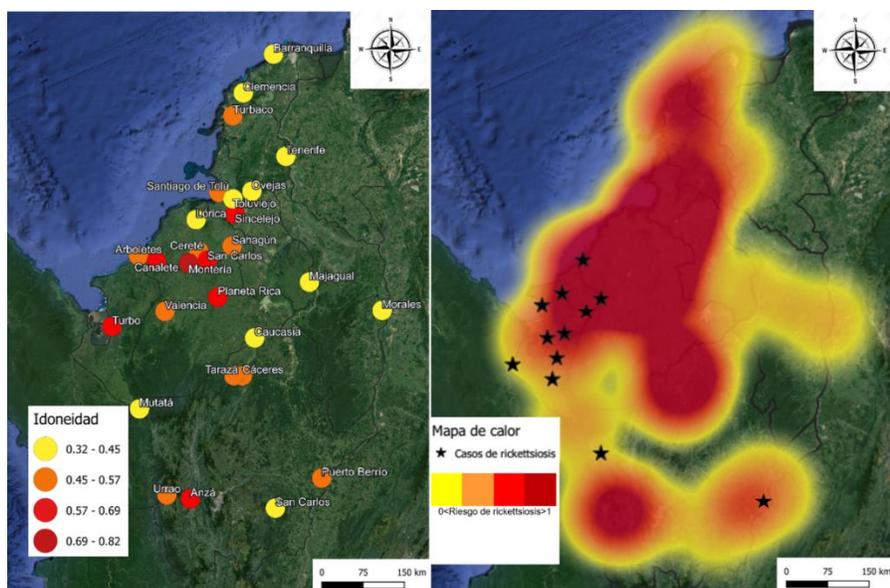


Figura 5-1. Mapas de idoneidad y de riesgo potencial para rickettsiosis mediante vigilancia de équidos como centinelas (realizado en QGIS 3.11 ®).

Tabla 5-2. Reporte de casos de rickettsiosis en el área de estudio

Sitio de reporte	Municipio	<i>Rickettsia</i> involucrada	Año	Referencia
Loma Verde	Montería	<i>R. rickettsii</i>	1985	[25]
Las Changas	Necoclí	<i>R. rickettsii</i>	2006	[8]
Los Córdoba	Los Córdoba	<i>R. rickettsii</i>	2007	[9]
Alto de Mulatos	Turbo	<i>R. rickettsii</i>	2007-2008	[10]
Apartadó	Apartadó	GFM	2007-2008	[26,27]
Turbo	Turbo	GFM	2007-2008	[26,27]
Necoclí	Necoclí	GFM	2007-2008	[26,27]
Uramita	Uramita	<i>R. rickettsii</i>	2014	[16]
Puerto López	Turbo	<i>R. parkeri</i> cepa Atlantic rainforest	2017	DSC
Chigorodó	Chigorodó	<i>R. rickettsii</i>	2017	[17,27]
San Pedro de Urabá	San Pedro de Urabá	GFM	2017	DSC
Puerto Berrio	Puerto Berrio	GFM	2017	DSC

GFM= *Rickettsia* del Grupo de Fiebre Manchada. DSC=Datos sin publicar Grupo Centauro

Discusión

Los resultados indican que en el área de estudio existen áreas potenciales de riesgo de rickettsiosis transmitidas por garrapatas que infestan a los équidos, proponiéndose subregiones específicas con mayor probabilidad. Estas subregiones están ubicadas en zonas con condiciones ecológicas diferentes, pero se resaltan las zonas costeras, de

sabana y de bosque húmedo tropical. Estas zonas aparentemente pueden proveer condiciones adecuadas del mantenimiento de ciclos de rickettsiosis (enzoótica o zoonótica) dados nuestros criterios, las zonas concuerdan en ser zonas de tierras bajas de clima cálido con numerosos bosques riparios con alto grado de intervención humana [28], y en algunos casos con sistemas de humedales (ciénagas y pantanos), donde el contacto de humanos con vectores de *Rickettsia* puede verse favorecido, considerando las condiciones propias de estas áreas [29].

El uso de AMCD ha sido previamente usado en otros agentes transmitidos por vectores, como *Trypanosoma cruzi* en Texas (Estados Unidos) y el virus de la fiebre del Valle del Rift en África, permitiendo detectar su utilidad para detectar áreas de riesgo [30,31]. Para el caso de la rickettsiosis, los modelos de riesgo se han venido implementando recientemente a través de diversas metodologías, especialmente en Brasil, donde la enfermedad si tiene vigilancia establecida y la eco-epidemiología es más conocida. Ejemplos de estos trabajos tenemos algunos realizados en Rio de Janeiro, Sao Paulo y Paraná han presentado propuestas de riesgo en zonas donde confluyen características ecológicas importantes para la bacteria [32–34].

El mapa de riesgo refleja la información con la cual fue alimentada, por lo cual puede presentar algunas limitaciones. Limitaciones que son derivadas principalmente del tipo de muestreo utilizado en el macroproyecto, como la selección de los animales por conveniencia, la incertidumbre en el dato probable de origen del animal, la utilización de fuentes secundarias en el caso de las coordenadas para el modelo de nicho ecológico, entre otras. Estas limitaciones se trataron de controlar al máximo, aunque fueron imposibles de eliminar.

La calidad del modelo es determinada por la calidad de los datos con la que se construye, pero, aun así, como lo indica Hongoh y colaboradores, a pesar de ser modelos basados en datos incompletos, sesgados o subóptimos aún pueden proporcionar información, teniendo en cuenta sus imprecisiones [19]. Por lo tanto, pese a las limitaciones previamente declaradas, se considera que el modelo obtenido nos da importante información de otras áreas donde el género *Rickettsia* puede estar circulando y donde potencialmente las personas podrían estar expuestas; información valiosa, especialmente en el contexto de la rickettsiosis que es una enfermedad desatendida y con datos limitados.

En Colombia el modelo obtenido coincide en una mayoría (83%) con los casos de rickettsiosis previamente reportados en la zona, y predice un área mayor de la conocida como de mediano y alto riesgo. Los datos que no coinciden corresponden a dos reportes particulares, el primero de Uramita (Antioquia), donde por el estudio que se hizo en campo se sospechaba de *Rh. sanguineus* s.l. como vector y el otro, de un caso de *R. parkeri* cepa Atlantic rainforest en Turbo, donde se sospecha como vector *Amblyomma ovale* dado que un estudio previo ha encontrado en la zona a estas garrapatas de la zona infectadas con esa bacteria [16,35]. Para ambos casos, las garrapatas sospechosas no suelen infestar comúnmente los équidos, lo cual es de algún modo coherente con la información con que fue construido el modelo.

Esta información soporta la necesidad de implementar un protocolo de vigilancia para rickettsiosis o estudios posteriores, por lo menos en las regiones que el modelo indica zonas de potencial riesgo, con el fin que se puedan contribuir de una manera más adecuada al conocimiento de estas enfermedades en la zona, validar el modelo propuesto y que se dé un manejo adecuado de los pacientes con el que se puedan evitar las secuelas o muertes causadas por la bacteria.

Bibliografía

- [1] Parola P, Paddock CD, Socolovschi C, Labruna MB, Mediannikov O, Kernif T, et al. Update on tick-borne rickettsioses around the world: A geographic approach. Clin Microbiol Rev 2013;26:657–702. doi:10.1128/CMR.00032-13.
- [2] Valbuena G, Walker DH. Infection of the endothelium by members of the order Rickettsiales. Thromb Haemost 2009;102:1071–9. doi:10.1160/TH09-03-0186.
- [3] Bennett JE, Dolin R, Blaser MJ. Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases. Elsevier Health Sciences.; 2009.
- [4] Díaz JS, Cataño JC. Fiebre manchada de las montañas rocosas: ni tan manchada ni tan montañosa como pensábamos. Infectio 2010;14:264–76.
- [5] Oteo JA, Nava S, Sousa R de, Mattar S, Venzal JM, Abarca K, et al. Guías Latinoamericanas de la RIICER para el diagnóstico de las rickettsiosis transmitidas por garrapatas. Rev Chil Infectología 2014;31:54–65.
- [6] Patino L, Afanador A, Paul JH. A Spotted Fever in Tobia, Colombia: Preliminary Report. Am J Trop Med Hyg 1937;s1-17:639–53.

- [7] Hidalgo M, Orejuela L, Fuya P. Rocky Mountain spotted fever, Colombia. *Emerg Infect* 2007;7.
- [8] Acosta J, Díaz A, Urquijo L, Rey G, Sepúlveda C, Herrera D, et al. Brote de *Rickettsia Rickettsii* en Necoclí, Antioquia, Colombia, 2006. *Inf Quinc Epidemiol Nac* 2006;11:177-86. Spanish.
- [9] Hidalgo M, Lizarazo D, Ovalle M, Castañeda E, Heredia D, Zambrano P, et al. Brote de rickettsiosis en Los Córdoba, departamento de Córdoba, febrero-marzo 2007. *Inf Quinc Epidemiol Nac* 2007;12:118-20. Spanish.
- [10] Pacheco O, Giraldo M, Martínez M, Hidalgo M, Galeano A, Echeverri E, et al. Estudio de brote febril hemorrágico en el corregimiento de Alto de Mulatos - Distrito Especial Portuario de Turbo, Antioquia, enero de 2008. *Inf Quinc Epidemiol Nac* 2008;13:145-60. Spanish.
- [11] Faccini-Martínez ÁA, A. R-H, Barreto C, Forero-Becerra E, Millán D, Valbuena E, et al. Epidemiology of spotted fever group rickettsioses and acute undifferentiated Febrile Illness in Villeta, Colombia. *Am J Trop Med Hyg* 2017;97:782-788. doi:10.4269/ajtmh.16-0442.
- [12] Londoño AF, Acevedo-Gutiérrez LY, Marín D, Contreras V, Díaz FJ, Valbuena G, et al. Human prevalence of the spotted fever group (SFG) rickettsiae in endemic zones of Northwestern Colombia. *Ticks Tick Borne Dis* 2017;8:477–82.
- [13] Ortiz J, Miranda J, Ortiz L, Navarro Y, Mattar S. Seroprevalencia de *Rickettsia* sp. en indígenas Wayuü de la Guajira y Kankuamos del Cesar, Colombia. *Infectio* 2015;19:18–23. doi:10.1016/j.infect.2014.11.003.
- [14] Arrieta-hernández N, Salgado-mercado A, Paternina LE, Martínez L, Vertel-morinson M, Paternina-gómez M, et al. Seroprevalencia de *Rickettsia* del grupo de las fiebres manchadas , en población humana de zona rural del municipio de Toluviejo , Colombia. *Rev Investig En Med Trop* 2015;1:8-13.
- [15] Miranda JL, Sánchez L, Amaya K, Máttar S. Primera prueba serológica de *Rickettsia* sp. del grupo de la fiebre manchada en el departamento del Meta. *Biomédica* 2011;31(Supl):105.
- [16] Londoño AF, Arango-Ferreira C, Acevedo-Gutiérrez LY, Paternina LE, Montes C, Ruiz I, et al. A Cluster of Cases of Rocky Mountain Spotted Fever in an Area Of

- Colombia Not Known to be Endemic for This Disease. *Am J Trop Med Hyg* 2019;101:336–42. doi:10.4269/ajtmh.18-1007.
- [17] Vélez JC, Faccini-Martínez ÁA, Rodas JD, Díaz FJ, Ramírez R, Somoyar P, et al. Fatal *Rickettsia rickettsii* infection in a child, Northwestern Colombia, 2017. *Ticks Tick Borne Dis* 2019;10:995–6.
- [18] Ministerio de Salud y Protección Social M. Plan decenal de salud. 2012.
- [19] Hongoh V, Hoen AG, Aenishaenslin C, Waub J-P, Bélanger D, Michel P. Spatially explicit multi-criteria decision analysis for managing vector-borne diseases. *Int J Health Geogr* 2011;10:70. doi:10.1186/1476-072X-10-70.
- [20] Buzai G. Metodología de evaluación multicriterio en el análisis espacial de la salud, 2014, p. 90–7.
- [21] Stevens KB, Pfeiffer DU. Spatial modelling of disease using data- and knowledge-driven approaches. *Spat Spatiotemporal Epidemiol* 2011;2:125–33. doi:10.1016/j.sste.2011.07.007.
- [22] Malczewski J. GIS-based multicriteria decision analysis: a survey of the literature. *Int J Geogr Inf Sci* 2006;20:703–26.
- [23] Malczewski J. On the Use of Weighted Linear Combination Method in GIS: Common and Best Practice Approaches. *T GIS* 2000;4:5–22. doi:10.1111/1467-9671.00035.
- [24] Acevedo-Gutiérrez LY, Parra-Henao G, Paternina LE, Londoño AF, Rodas JD. Modelos potenciales de distribución geográfica y climática del complejo *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae), potencial vector de *Rickettsia rickettsii* en Colombia. *Biomédica* 2018;38:534–44. doi:10.7705/biomedica.v38i4.3916.
- [25] Bustos A. Fiebre manchada. Informe de un caso. *Apunt Médicos Un Boletín Mens* 1985;2:2.
- [26] Arroyave E, Londoño AF, Quintero JC, Agudelo P, Arboleda M, Díaz FJ, et al. Etiology and epidemiological characterization of non-malarial febrile syndrome in three municipalities of Uraba (Antioquia), Colombia. *Biomedica* 2013.
- [27] Gil-Lora EJ, Patiño-Gallego JJ, Acevedo-Gutiérrez LY, Montoya-Ruiz C, Rodas-González JD. Infección y enfermedad por *Rickettsia* spp. del grupo de las fiebres manchadas en pacientes febriles del Urabá antioqueño, Colombia. *Iatreia n.d.*;1.

- [28] Mendoza-C H. Estructura y riqueza florística del bosque seco tropical en la región Caribe y el valle del río Magdalena, Colombia. *Caldasia* 1999;70–94.
- [29] Labruna MB. Ecology of rickettsia in South America. *Ann N Y Acad Sci* 2009;1166:156–66. doi:10.1111/j.1749-6632.2009.04516.x.
- [30] Sarkar S, Strutz SE, Frank DM, Rivaldi C, Sissel B, Sánchez–Cordero V. Chagas disease risk in Texas. *PLoS Negl Trop Dis* 2010;4:e836.
- [31] Clements ACA, Pfeiffer DU, Martin V. Application of knowledge-driven spatial modelling approaches and uncertainty management to a study of Rift Valley fever in Africa. *Int J Health Geogr* 2006;5:57.
- [32] Otomura FH, Sangioni LA, Pacheco RC, Labruna MB, Galhardo JA, Ribeiro MG, et al. Anticorpos anti-rickettsias do grupo da febre maculosa em equídeos e caninos no norte do Estado do Paraná, Brasil. *Arq Bras Med Vet e Zootec* 2010;62:761–4. doi:10.1590/S0102-09352010000300037.
- [33] Silveira AK, Bernardo-Pedro T. Modelagem geoambiental aplicada à favorabilidade de ocorrência de carrapatos vetores de febre maculosa no município de Seropédica, RJ n.d.
- [34] Nasser JT, Lana RC, Silva CM dos S, Lourenço RW, Silva DC da C, Donalísio MR. Urbanization of Brazilian spotted fever in a municipality of the southeastern region: epidemiology and spatial distribution. *Rev Bras Epidemiol* 2015;18:299–312.
- [35] Londoño AF, Díaz FJ, Valbuena G, Gazi M, Labruna MB, Hidalgo M. Infection of *Amblyomma ovale* by *Rickettsia* sp. strain Atlantic rainforest, Colombia. *Ticks Tick Borne Dis* 2014;5. doi:10.1016/j.ttbdis.2014.04.018.

Capítulo 6. Anexo

Evidencia serológica de la exposición en équidos del noroeste de Colombia a *Ehrlichia* spp. y *Coxiella burnetii*

Resumen

Las garrapatas son consideradas, junto con los mosquitos, como uno de los principales vectores de agentes causales de enfermedades infecciosas, entre las cuales cabe mencionar y destacar la ehrlichiosis y la fiebre Q, dado su impacto sobre la salud humana y animal. Los equinos se han postulado como centinelas de algunas de estas enfermedades dado que pueden ser infestados por diversas especies de garrapatas y ser infectados por agentes transmitidos por estos artrópodos.

El objetivo fue determinar la proporción de seropositividad contra *Ehrlichia* spp. y *C. burnetii* en équidos del noroeste de Colombia, sus factores demográficos, ecológicos y potenciales áreas de riesgo, para el cual se realizó un estudio descriptivo transversal en équidos en los cuales se realizó inmunofluorescencia indirecta para *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia chaffeensis* y *C. burnetii*. Se determinó el título de anticuerpos en las muestras positivas con un punto de corte de 1/80 y 1/64 para *Ehrlichia* spp. y *Coxiella burnetii*, respectivamente. Se realizaron pruebas moleculares para los genes *16s ARNr* y *dsb* para *Ehrlichia*. Se utilizaron Sistemas de información geográfico para identificar potenciales áreas de circulación.

La seropositividad para *Ehrlichia* fue de 4,8% con títulos entre 80 y 2560, y del 5,6% para *C. burnetii* con títulos entre 64 y 256. Se encontraron muestras positivas para *Ehrlichia* spp. en los departamentos de Antioquia, Córdoba y Sucre, y para *C. burnetii* en Antioquia, Bolívar y Córdoba. No se obtuvo evidencia molecular para *Ehrlichia* spp. Se identificó un conglomerado para *Ehrlichia* spp. en parte de la región del Urabá antioqueño y en gran parte del departamento de Córdoba, y para *C. burnetii*, en el norte del Urabá antioqueño y el noroeste de Córdoba.

En este trabajo se evidencia seropositividad de *Ehrlichia* spp. y *C. burnetii* en équidos provenientes de la región noroeste de Colombia. Las seropositividades encontradas fueron inferiores al 6%, indicando que este tipo de infecciones en los équidos de esta área son poco frecuentes. Se sugiere la realización de estudios posteriores con el fin de complementar el conocimiento de las infecciones de estos agentes.

Introducción

Las garrapatas juegan un reconocido papel como vector de diversos patógenos para el hombre y los animales, tales como los virus, las bacterias y los protozoos. El rango de agentes es tan amplio, que se ha aseverado que las garrapatas pueden transmitir un número similar de agentes patógenos al de los mosquitos [1]. Entre las bacterias importantes transmitidas por garrapatas se cuenta con representantes de la familia Anaplasmataceae y Coxiellaceae [2].

La familia Anaplasmataceae se compone de bacterias Gram negativas intracelulares obligadas y está constituida por cuatro géneros, a saber, *Ehrlichia*, *Anaplasma*, *Wolbachia* y *Neorickettsia*, recientemente se ha propuesto la creación de un género para contener a cuatro nuevas especies rickettsiales contenidas en el género “*Candidatus Neoehrlichia*” [3]. Las especies del género *Ehrlichia* y *Anaplasma* se han reportado como patógenos en diferentes especies de mamíferos silvestres y domésticos, incluyendo al hombre [4], afectando diferentes células sanguíneas y según la especie pueden infectar neutrófilos, monocitos, eritrocitos, macrófagos, plaquetas y células endoteliales de los mamíferos hospederos [5].

Las especies de *Ehrlichia* se multiplican en un amplio rango de huéspedes vertebrados entre los cuales se encuentran caninos, felinos, rumiantes, equinos y el hombre. *Ehrlichia chaffeensis* y *Ehrlichia ewingii* se consideran agentes importantes como patógenos en humanos, produciendo Ehrlichiosis Monocítica Humana (HME) y Ehrlichiosis Granulocítica Humana respectivamente, aunque también se han reportado algunas exposiciones e infecciones en humanos por *E. canis* como los reportados en Venezuela y Costa Rica [4,6,7]. Igualmente, en medicina veterinaria *E. canis*, *E. ewingii*, y *Ehrlichia ruminantium* se consideran patógenos de importancia clínica y epidemiológica. Recientemente se han descrito diversas especies candidatas, como por ejemplo “*Candidatus Ehrlichia minasensis*”, *Ehrlichia* sp. Strain Tibet, “*Candidatus Ehrlichia shimanensis*”, “*Candidatus Ehrlichia muris-like*” (EML), *Ehrlichia* cepa Panola mountain (PME), “*Candidatus Neoehrlichia lotoris*” y “*Candidatus Neoehrlichia mikurensis*” [2]. Estos datos sugieren mayor diversidad de especies de la familia Anaplasmataceae.

En la familia Coxiellaceae encontramos bacterias de la clase Gamaproteobacteria, donde resalta por su papel como agente causal de fiebre Q, la especie *Coxiella burnetii*. Esta bacteria es un cocobacilo pleomórfico Gram negativo que tiene como célula banca los macrófagos. Se ha identificado infectando un grupo amplio de hospederos, pero las más

comúnmente afectados corresponden a bovinos, ovinos y caprinos. El mantenimiento de la bacteria suele darse en garrapatas y otros artrópodos, adicionalmente puede sobrevivir en el ambiente o en fluidos de los animales infectados por largo tiempo. La fiebre Q puede cursar de formas leves a severas, donde se pueden presentar neumonías y endocarditis [8,9].

Tanto *Ehrlichia* spp. como *C. burnetii* pueden infectar a los équidos. Por ejemplo, en Estados Unidos, Nicaragua y Brasil se ha detectado serológica o molecularmente la circulación de *Ehrlichia* en este tipo de hospederos, aunque su capacidad patogénica aun es desconocida [10–12]. En cuanto *C. burnetii* también se cuenta con evidencia de su infección en los équidos en países como Estados Unidos, Canadá y Corea del Sur, por ejemplo [13,14]. En los équidos se vincula esta bacteria como causante de abortos y como fuente de infección para otros hospederos [15].

En Colombia los reportes de estas bacterias en los équidos son ausentes, por lo cual, ante este estado del conocimiento, los reportes recientes en este campo y el potencial impacto en salud animal que puedan presentar, se tiene como objetivo determinar la proporción de seropositividad contra *Ehrlichia* spp. y *C. burnetii* en équidos del noroeste de Colombia, sus factores demográficos, ecológicos y potenciales áreas de riesgo.

Materiales y métodos

Se realizó un estudio analítico transversal el cual se ejecutó siguiendo la metodología previamente en el capítulo 2 estableciendo la hipótesis que la seropositividad para *Ehrlichia* y *C. burnetii* en équidos está relacionada con factores demográficos y ecológicos de los animales. El desenlace o variable dependiente fue definida como équido con presencia o ausencia de seropositividad a *Ehrlichia* spp. y *C. burnetii* por la prueba de Inmunofluorescencia Indirecta (IFI) considerando los títulos de ≥ 80 y ≥ 64 , respectivamente. El procesamiento de las muestras correspondió a una parte serológica y molecular. La serología se realizó con una IFI para los sueros. En el análisis de *Ehrlichia* se utilizaron los antígenos de *E. canis* cepa Sao Paulo y *E. chaffeensis* cepa Arkansas en una dilución $\geq 1/80$ como punto de corte y para el antígeno de *C. burnetii* cepa At12, se utilizó una dilución de $\geq 1/64$ [16–18]. Como anticuerpo secundario se usó un IgG anti-caballo comercial (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU.). A las muestras positivas se les realizaron diluciones dobles seriadas para encontrar la dilución de punto final. En el caso las muestras positivas por IFI para *Ehrlichia* se exploró la presencia en el ADN en muestras de sangre entera. Este proceso adicional se realizó teniendo en cuenta que este

género se ha reportado afectando células hematológicas y por lo tanto la probabilidad de encontrar bacteremia es mayor que en el caso de *C. burnetii*. El ADN se extrajo utilizando el kit GeneJET Genomic DNA Purification Kit (Thermo Fisher ®) siguiendo las indicaciones del fabricante. A la muestra se le verificó la ausencia de inhibidores por el gen B-actina. Se usaron los cebadores para los genes del 16S rRNA de la familia Anaplasmataceae y para la proteína de unión disulfuro (*dsb*) en la detección de *Ehrlichia*.

Tabla 6-1. Cebadores para la detección e identificación de *Ehrlichia*

Gen	Cebadores	Referencia
<i>Actina B</i>	ActBF 5'-CCGGACTCATCGTACTCCTG-3' ActBR 5'-TATGGAATCCTGTGGCATCC-3'	[19,20]
16S rRNA	EHR16SD 5'-GGTACCYACAGAAGAAGTCC-3' EHR16SR 5'-TAGCACTCATCGTTTACAGC-3'	[21]
<i>dsb</i>	Dsb330 5'-GATGATGTCTGAAGATATGAAACAAAT-3' Dsb728 5'-CTGCTCGTCTATTTTACTTCTTAAAG-T3'	[22]

Resultados

Se encontró evidencia de exposición a *Ehrlichia* en 31 muestras positivas de 649 équidos analizados para una seropositividad del 4.78% (IC_{95%} 3.33-6.63). Las muestras positivas se encontraron en 13 municipios, correspondientes a Anzá, Arboletes, Puerto Berrío y Turbo en el departamento de Antioquia, en Canalete, Cereté, Montería, Planeta Rica, San Carlos y Valencia del departamento de Córdoba, y en Santiago de Tolú, Sincelejo y Toluvié en Sucre (Figura 6-1).

Los títulos de anticuerpos estuvieron en un rango de 80 hasta 2560 para el antígeno de *E. canis* y de 80 hasta 5120 para *E. chaffeensis*, con unas medias geométricas de 209.2 y 437.6, respectivamente para cada antígeno usado. En la figura 6-2, se presentan la distribución general de los títulos de anticuerpos. En el estudio molecular para *Ehrlichia* en las muestras de sangre de los équidos, no se encontraron muestras positivas para ambos genes. Las muestras de ADN no presentaban inhibidores, por confirmación con el gen de la B-actina.

C. burnetii, presentó una proporción general del 5.55% (IC_{95%} 3.97-7.52), que correspondió a 36 muestras positivas de 649. Las muestras positivas se distribuyeron en 14 municipios, a saber, Arboletes, Cáceres, Caucasia, Mutatá, Tarazá y Turbo en Antioquia, en Clemencia y Morales en Bolívar, y Canaletes, Cereté, Montería, Planeta Rica, Sahagún y Valencia en el departamento de Córdoba (Figura 6-1). Las muestras presentaron títulos de 64 (n=12), 128 (n=15) y 256 (n=9), con una media geométrica de 120.8.

Identificación de potenciales áreas de riesgo de rickettsiosis en el noroeste de Colombia a través del uso de équidos como centinelas

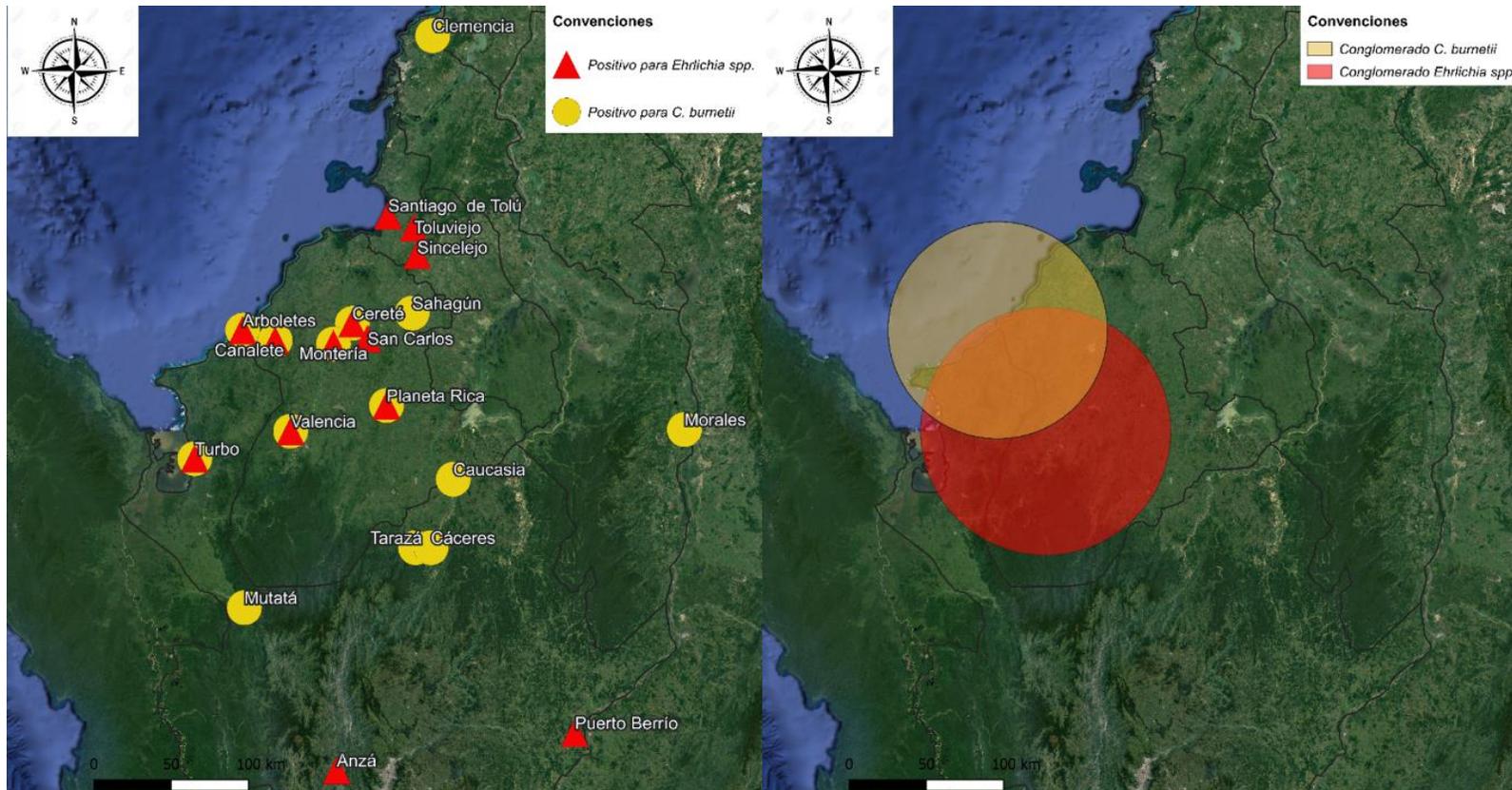


Figura 6-1. Mapa de la distribución espacial de las muestras seropositivas y de los conglomerados para *Ehrlichia* y *C. burnetii* en équidos

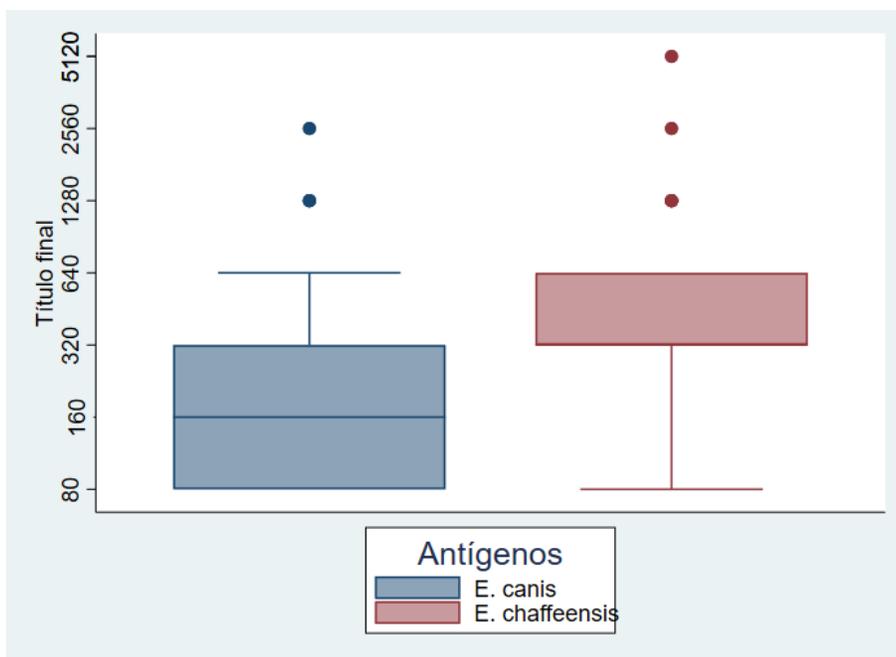


Figura 6-2. Dispersión de los títulos de anticuerpos por cada especie de *Ehrlichia* analizada.

En el análisis estadístico bivariado se encontraron asociaciones estadísticas en las variables de infestación con garrapatas y con *A. cajennense* s.l. para la presencia de anticuerpos contra *Ehrlichia*. Para *C. burnetii* las variables encontradas como significantes fueron la especie de équido, infestación con garrapatas y con *Rh. microplus* (Tabla 6-2).

Los modelos multivariados indican que los animales infestados por *A. cajennense* s.l. pueden tener tres veces más riesgo de ser seropositivos contra *Ehrlichia*, además de un 64% más de riesgo si provienen de zonas húmedas respecto a zonas áridas. Este modelo a través del valor p de su varianza confirman el efecto aleatorio que tiene la variable municipio, lo que significa que si hay diferencias en los municipios con respecto a la seropositividad. Para *C. burnetii* se puede identificar como factor de riesgo el estar infestados por garrapatas, y como marcador de riesgo la especie de équido. El riesgo de seropositividad es dos veces y medio mayor para la infestación respecto a los équidos no infestados, y del 69% si eran *E. caballus* y *E. asinus* x *E. caballus*, con relación a ser *E. asinus*. El valor p de la varianza indica que no hay diferencias respecto a la seropositividad entre los diferentes municipios, lo cual es coherente con los valores de los indicadores de AIC y BIC, que son mejores en el modelo nulo (Tabla 3).

Tabla 6-2. Descripción de los hallazgos por seropositividad para *Ehrlichia* y *C. burnetii* según las variables estudiadas.

Variables	<i>Ehrlichia</i>			<i>C. burnetii</i>			N
	n (%)	RP (IC95%)	valor p	n (%)	RP (IC95%)	valor p	
Especie de équido	<i>E. asinus</i>	10 (3.7)	1.45	4 (1.5)	5.51	0.019	267
	<i>E. caballus</i>	19 (5.4)	(0.7-3.1)	29 (8.3)	(2-14.5)		351
	<i>E. asinus x E. caballus</i>	2 (6.5)	1.84 (0.4-7.8)	3 (9.7)	6.46 (1.5-24.4)		31
Sexo	Hembra	16 (4.9)	0.95	14 (4.3)	1.59	0.169	326
	Macho	15 (4.6)	(0.5-1.9)	22 (6.8)	(0.8-3.1)		323
Edad cuartiles (años)	0-7	5 (3)	1.28 (0.9-1.8)	6 (3.6)	1.2 (0.9-1.6)	0.226	169
	8-12	7 (3.9)		12 (6.7)			180
	12-15	10 (7.1)		6 (4.3)			141
	>15	9 (5.8)		12 (7.7)			156
Clima	Árido	-	1.74 (1.1-2.8)	2 (4.5)	0.78 (0.5-1.2)	0.208	44
	Semiárido	19 (4.5)		24 (5.7)			27
	Húmedo	-		5 (18.5)			421
	Semihúmedo	12 (8.4)		4 (2.8)			143
	Superhúmedo	-		1 (7.1)			14
Infestación garrapatas	Ausente	7 (2.6)	2.38	7 (2.6)	2.93	0.009	269
	Presente	24 (6.3)	(1-5.3)	29 (7.6)	(1.3-6.4)		380
Infestación <i>A. cajennense</i> s.l.	Ausente	17 (3.3)	3.2	27 (5.2)	1.3	0.493	516
	Presente	14 (10.5)	(1.6-6.1)	9 (6.8)	(0.6-2.7)		133
Infestación <i>D. nitens</i>	Ausente	13 (3.8)	1.54	11 (3.2)	2.54	0.237	342
	Presente	18 (5.9)	(0.8-3.1)	25 (8.1)	(1.3-5)		307
Infestación <i>Rh. microplus</i>	Ausente	26 (4.4)	1.94	31 (5.2)	1.76	0.009	591
	Presente	5 (8.6)	(0.8-4.8)	5 (8.6)	(0.7-4.3)		58

Tabla 6-3. Factores y marcadores de riesgo asociados con la seropositividad a *Ehrlichia* y *C. burnetii* en équidos. Regresión Log-log complementaria multinivel.

Agente	Variable	Modelo nulo		Modelo	
		RP IC(95%)	valor p	RP IC(95%)	valor p
<i>Ehrlichia</i>	Infestación por <i>A. cajennense</i> s.l.			3.04 (1.5-6.1)	0.02
	Clima			1.64 (1.0-2.7)	0.053
	Varianza (error estándar)	0.397 (0.486)	1.07	6.44x10 ⁻³⁴ (1.47x10 ⁻¹⁷)	0.01
	AIC	252		241.1	
	BIC	261		254.5	
<i>C. burnetii</i>	Infestación por garrapatas			2.56 (1.1-5.7)	0.024
	Especie de equino			1.69 (1.2-2.5)	0.07
	Varianza (error estándar)	0.238 (0.424)	0.34	0.082 (0.412)	0.05
	AIC	271.6		281.8	
	BIC	289.5		290.8	

Los ensayos espaciales permitieron detectar un conglomerado para cada uno de los agentes explorados. El conglomerado para *Ehrlichia* se ubica en parte de la región del Urabá antioqueño y gran parte del departamento de Córdoba, además presenta una razón de prevalencia (RP) de 3.93 (IC_{95%} 1.20-129.2), lo cual es cuatro veces mayor que en el resto de la región de estudio. Para *C. burnetii*, el conglomerado es más pequeño y abarca la parte norte del Urabá antioqueño y el noroeste de Córdoba. El riesgo en este sitio es 3.5 veces mayor según el dato de la RP (IC_{95%} 1.27-9.46) (Figura 6-1).

Discusión

En este trabajo se evidencia la seropositividad a *Ehrlichia* spp. y *C. burnetii* en équidos provenientes de la región noroeste de Colombia. Las seropositividades encontradas fueron inferiores al 6%, indicando que este tipo de infecciones en los équidos de esta área son poco frecuentes. Los hallazgos de estos agentes han estado relacionados recientemente en los équidos en diversos continentes en países como Brasil, Estados Unidos, Italia, Nicaragua, China, Bulgaria, entre otros; demostrando que son procesos que se dan a nivel mundial [10-14, 23-27].

Nuestros resultados para *Ehrlichia*, se asemejan a los encontrados en Foz de Iguazú (Brasil) con la misma técnica y antígeno, aunque difieren en el punto de corte usado por ellos que fue 1/40, por lo cual podemos suponer que potencialmente nuestra

seropositividad puede ser un poco mayor a la observada por ellos [23]. Estudios en el continente americano ha identificado seropositividades superiores, como el 24.7% (18/73) por IFI para *E. chaffeensis* en los Estados Unidos [28], del 55% (51/92) por la prueba SNAP 4Dx en Nicaragua [12], del 33.7% (64/), 62.5% (10/16) y 50% (8/16) por IFI y SNAP 4Dx en el sur de Brasil [10,18]. Estas diferencias pueden darse debido a las características ecológicas propias del agente, o la técnica usada, ya que la prueba de SNAP 4Dx demostró en algunos casos un mayor número de positivos comparado con la IFI [18].

Los títulos obtenidos pueden indicar algunas infecciones recientes por sus altos valores y también que la bacteria relacionada con la infección en los équidos es antigénicamente más cercana a *E. chaffeensis*, pero se requieren estudios posteriores para su caracterización. Otro punto importante por considerar es que la técnica utilizada puede generar en algunos casos reacciones cruzadas con especies de la familia Anaplasmataceae, como ha sido reportado por Biggs y colaboradores [29]. Los agentes vinculados con reacción cruzada pueden ser *Anaplasma phagocytophilum*, *Neorickettsia risticii* e incluso entre diferentes especies de *Ehrlichia* como por ejemplo *E. minasensis*, las cuales ya han sido previamente reportadas en Centro y Suramérica en equinos o animales silvestres como murciélagos [30-34].

Las garrapatas se vinculan como vectores de *Ehrlichia*. y *C. burnetii*, esto posibilita tenerlos como elementos clave para futuras investigaciones. En Colombia se han detectado en garrapatas de las especies *Rh. microplus*, *Rh. sanguineus* s.l. y *D. nitens*, algunas bacterias de la familia Anaplasmataceae como *E. canis*, *E. chaffeensis*, *E. ewingii*, *E. minasensis* y *Anaplasma phagocytophilum* utilizando el gen *16S rRNA*, lo cual a su vez nos indica la necesidad de ampliar este conocimiento con el uso de otros genes que permitan una mejor caracterización y conocer con certeza las especies de la familia circulando en el país [35]. También se sugiere tener en cuenta una potencial participación de especies del complejo *A. cajennense* en la seropositividad, esto a la luz de los resultados arrojados por el análisis multivariado que nos muestra que los équidos con estas infestaciones tienen un mayor riesgo de tener anticuerpos. Las especies de este complejo han sido previamente vinculadas como vectores de múltiples agentes, por lo cual las sospechas que se cierne sobre ellas pueden tener un soporte [36,37].

No se detectó la evidencia de la circulación en sangre con el uso de los genes *16S rRNA* para la familia Anaplasmataceae, ni con el gen *dsb* específico del género *Ehrlichia*. Esto

puede ser resultado de varios procesos, tales como que se haya dado la autorresolución de la infección por parte del animal, niveles de infección bajas que sean indetectables por la prueba molecular, o incluso que la infección se encuentre en una fase de la historia natural del agente donde no puede ser detectado como en el periodo de incubación, o una fase de latencia o sublatencia. Estudios previos en la zona de estudio y en Estados Unidos también han encontrado resultados similares [38,39]. En países como Nicaragua y Brasil, estas búsquedas han sido exitosas e incluso han permitido postular que el material genético encontrado puede ser de una nueva especie de *Ehrlichia* cercana a *E. ruminantium* [40,41]. Según comunicaciones personales con el Dr. Daniel Aguiar, también han podido detectar en équidos la especie *E. minasensis*, por lo cual esta especie debe ser tenida en cuenta como un posible agente infectando a los équidos. A pesar de que esta especie regularmente infecta a bovinos, en algunas explotaciones pecuarias ambas especies de mamíferos comparten pasturas, e incluso pueden presentar la garrapata que se ha postulado como vector, *Rh. microplus*, lo que puede generar la transmisión cruzada [42].

Para *C. burnetii* se identificaron animales seropositivos, lo cual ha sido previamente informado [8]. Estos hallazgos son importantes debido a que se reconoce la capacidad de *Coxiella* de infectar a los équidos e incluso causarles abortos [15]. Existen reportes previos de brotes relacionados con actividades recreativas que involucren el contacto con estos mamíferos [13,15,43,44]. En un brote en Holanda, el contacto de personas con caballos y ponis, o la limpieza de los establos, fueron considerados como un potencial factor de riesgo, sugiriendo la capacidad de transmisión desde équidos infectados [43]. Revisiones sobre el tema también sugieren que, aunque los equinos nos son reservorios para la bacteria, si pueden ser una fuente de infección para otros animales, incluido el hombre e incluso ser considerado como centinela [15,24]. En Colombia se han reportado pocos estudios sobre esta bacteria, pero se reconoce su circulación y como agente causal de enfermedad en humanos, por lo cual nuestros datos amplían este conocimiento de lugares donde se pueda dar potencialmente la exposición, especialmente en un ámbito ocupacional [45–47].

En la actualidad el conocimiento del género *Coxiella* ha ido aumentando. Previamente se consideraba que la única especie patógena del género *Coxiella* era *C. burnetii*, pero algunos hallazgos sugieren la existencia de otros agentes bacterianos relacionado que podrían estar involucradas en procesos infecciosos. En Corea del Sur, se ha encontrado

evidencia serológica y molecular en caballos de infección por *Coxiella*-like y *C. burnetii*, indicando un riesgo de exposición de estos animales y sus contactos, además de una potencial reacción cruzada en las pruebas serológicas para ambas bacterias [14,48]. *Coxiella*-like se ha considerado como un endosimbionte de las garrapatas, pero su interés e impacto ha aumentado debido a la presentación de posibles infecciones, como la reportada en 2017 un paciente con escara, linfadenopatía y bacteremia, que en los procesos de investigación dio positivo para una bacteria *Coxiella*-like, sugiriendo su participación como agente causal [49].

Se sugiere la realización de estudios posteriores con el fin de complementar el conocimiento de las infecciones de estos agentes. La utilización de diversas pruebas ELISA o PCR en tiempo real pueden aumentar la sensibilidad para la detección de estos agentes y facilitar su caracterización. A su vez, los análisis multivariados y espaciales ofrecen elementos claves con el fin de priorizar algunas zonas para hacer los ensayos posteriores.

Referencias

- [1] Dantas-Torres F, Chomel BB, Otranto D. Ticks and tick-borne diseases: A One Health perspective. *Trends Parasitol* 2012;28:437–46. doi:10.1016/j.pt.2012.07.003.
- [2] Ismail N, McBride JW. Tick-Borne Emerging Infections. *Clin Lab Med* 2017;37:317–40. doi:10.1016/j.cll.2017.01.006.
- [3] Portillo A, Santibáñez P, Palomar AM, Santibáñez S, Oteo JA. 'Candidatus Neorickettsia mikurensis' in Europe. *New Microbes New Infect* 2018;22:30–6.
- [4] Dumler JS, Barbet AF, Bekker CP, Dasch GA, Palmer GH, Ray SC, et al. Reorganization of genera in the families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in the order Rickettsiales: unification of some species of Ehrlichia with Anaplasma, Cowdria with Ehrlichia and Ehrlichia with Neorickettsia, descriptions of six new species combi. *Int J Syst Evol Microbiol* 2001;51:2145–65.
- [5] Thomas RJ, Dumler JS, Carlyon J a. Current management of human granulocytic anaplasmosis, human monocytic ehrlichiosis and Ehrlichia ewingii ehrlichiosis. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2009;7:709–22. doi:10.1586/eri.09.44.
- [6] Perez M, Bodor M, Zhang C, Xiong Q, Xiong Q, Rikihisa Y. Human infection with Ehrlichia canis accompanied by clinical signs in Venezuela. *Ann N Y Acad Sci* 2006;1078:110–7. doi:10.1196/annals.1374.016.

- [7] Bouza-mora L, Dolz G, Solórzano-morales A, Romero-zu JJ, Salazar-sánchez L, Labruna MB, et al. Novel genotype of Ehrlichia canis detected in samples of human blood bank donors in Costa Rica. Ticks Tick Borne Dis 2016. doi:10.1016/j.ttbdis.2016.09.012.
- [8] Bennett JE, Dolin R, Blaser MJ. Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases. Elsevier Health Sciences.; 2009.
- [9] Contreras V, González M, Guzmán C, Máttar S. Fiebre Q: una zoonosis olvidada en Colombia Q fever: a neglected zoonosis in Colombia. Rev Med Risaralda 2013;19:137–46.
- [10] Vieira RF, Vieira TSWJ, Nascimento D do AG, Martins TF, Krawczak FS, Labruna MB, et al. Serological survey of Ehrlichia species in dogs, horses and humans: zoonotic scenery in a rural settlement from southern Brazil. Rev Inst Med Trop Sao Paulo 2013;55:335–40. doi:10.1590/s0036-46652013000500007.
- [11] Duell JR, Carmichael R, Herrin BH, Holbrook TC, Talley J, Little SE. Prevalence and species of ticks on horses in central Oklahoma. J Med Entomol 2013;50:1330–3.
- [12] O'Nion VL, Montilla HJ, Qurollo BA, Maggi RG, Hegarty BC, Tornquist SJ, et al. Potentially novel Ehrlichia species in horses, Nicaragua. Emerg Infect Dis 2015. doi:10.3201/eid2102.140290.
- [13] George J, Marrie TJ. Serological evidence of Coxiella burnetii infection in horses in Atlantic Canada. Can Vet J 1987;28:425.
- [14] Seo MG, Lee SH, VanBik D, Ouh IO, Yun SH, Choi E, et al. Detection and genotyping of Coxiella burnetii and Coxiella-like bacteria in horses in South Korea. PLoS One 2016;11:1–11. doi:10.1371/journal.pone.0156710.
- [15] Marenzoni ML, Stefanetti V, Papa P, Casagrande Proietti P, Bietta A, Coletti M, et al. Is the horse a reservoir or an indicator of Coxiella burnetii infection? Systematic review and biomolecular investigation. Vet Microbiol 2013;167:662–9. doi:10.1016/j.vetmic.2013.09.027.
- [16] Souza EAR de, Castro EMS de, Oliveira GMB de, Azevedo SS, Peixoto R de M, Labruna MB, et al. Serological diagnosis and risk factors for Coxiella burnetii in goats and sheep in a semi-arid region of Northeastern Brazil. Rev Bras Parasitol Veterinária 2018;27:514–20.

- [17] Krawczak F da S, Labruna MB, Sangioni LA, Vogel FSF, Soares JF, Lopes ST dos A. Serological survey on Ehrlichia sp. among dogs in the central region of Rio Grande do Sul. *Rev Bras Parasitol Veterinária* 2012;21:415–7.
- [18] Vieira TS, Vieira RF, Krawczak FS, Soares HS, Guimarães AM, Barros-Filho IR, et al. Ehrlichia sp. infection in carthorses of low-income owners, Southern Brazil. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 2016;48:1–5. doi:10.1016/j.cimid.2016.07.002.
- [19] Alonso S, Minty A, Bourlet Y, Buckingham M. Comparison of three actin-coding sequences in the mouse; evolutionary relationships between the actin genes of warm-blooded vertebrates. *J Mol Evol* 1986;23:11–22.
- [20] László CF, Wu S. Mechanism of UV-Induced I κ B α -Independent Activation of NF- κ B. *Photochem Photobiol* 2008;84:1564–8.
- [21] Inokuma H, Raoult D, Brouqui P. Detection of Ehrlichia platys DNA in brown dog ticks (*Rhipicephalus sanguineus*) in Okinawa Island, Japan. *J Clin Microbiol* 2000;38:4219–21.
- [22] Doyle CK, Labruna MB, Breitschwerdt EB, Tang Y-W, Corstvet RE, Hegarty BC, et al. Detection of Medically Important Ehrlichia by Quantitative Multicolor TaqMan Real-Time Polymerase Chain Reaction of the dsb Gene. *J Mol Diagnostics* 2005;7:504–10. doi:[https://doi.org/10.1016/S1525-1578\(10\)60581-8](https://doi.org/10.1016/S1525-1578(10)60581-8).
- [23] Valente JDM, Mongruel ACB, Machado CAL, Chiyo L, Leandro AS, Britto AS, et al. Tick-borne pathogens in carthorses from Foz do Iguaçu City, Paraná State, southern Brazil: A tri-border area of Brazil, Paraguay and Argentina. *Vet Parasitol* 2019;273:71–9. doi:<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2019.08.008>.
- [24] Tyrrell, J. D., Qurollo, B. A., Tornquist, S. J., Schlaich, K. G., Kelsey, J., Chandrashekar, R., & Breitschwerdt, EB. Molecular identification of vector-borne organisms in Ehrlichia seropositive Nicaraguan horses and first report of Rickettsia felis infection in the horse. *Acta tropica*. 2019; 200:105170.
- [25] Desjardins, I., Joulié, A., Pradier, S., Lecollinet, S., Beck, C., Vial, L., ... & Sidi-Boumedine, K.. Seroprevalence of horses to Coxiella burnetii in an Q fever endemic area. *Veterinary microbiology*, 2018;215:49-56.
- [26] Tsachev, I., Pantchev, N., Marutsov, P., Petrov, V., Gundasheva, D., & Baymakova, M. (2018). Serological evidence of Borrelia burgdorferi, Anaplasma phagocytophilum and

Ehrlichia spp. infections in horses from Southeastern Bulgaria. Vector-Borne and Zoonotic Diseases, 2018;18: 588-594.

[27] Li, J., Li, Y., Moumouni, P. F. A., Lee, S. H., Galon, E. M., Tumwebaze, M. A., ... & Benedicto, B. (2020). First description of Coxiella burnetii and Rickettsia spp. infection and molecular detection of piroplasma co-infecting horses in Xinjiang Uygur Autonomous Region, China. Parasitology International, 2020;76:102028.

[28] Duell JR, Carmichael R, Herrin BH, Holbrook TC, Talley J, Little SE. Prevalence and species of ticks on horses in central Oklahoma. J Med Entomol 2013;50:1330–3.

[29] Biggs HM, Behravesh CB, Bradley KK, Dahlgren FS, Drexler NA, Dumler JS, et al. Diagnosis and Management of Tickborne Rickettsial Diseases: Rocky Mountain Spotted Fever and Other Spotted Fever Group Rickettsioses, Ehrlichioses, and Anaplasmosis — United States. MMWR Recomm Reports 2016. doi:10.15585/mmwr.rr6502a1.

[30] Teglas M, Matern E, Lein S, Foley P, Mahan SM, Foley J. Ticks and tick-borne disease in Guatemalan cattle and horses. Vet Parasitol 2005;131:119–27. doi:10.1016/j.vetpar.2005.04.033.

[31] Dutra F, Schuch LFD, Delucchi E, Curcio BR, Coimbra H, Raffi MB, et al. Equine monocytic Ehrlichiosis (Potomac horse fever) in horses in Uruguay and southern Brazil. J Vet Diagnostic Investig 2001;13:433–7.

[32] Cicuttin GL, Boeri EJ, Beltrán FJ, Gury Dohmen FE. Molecular detection of Neorickettsia risticii in Brazilian free-tailed bats (Tadarida brasiliensis) from Buenos Aires, Argentina. Pesqui Veterinária Bras 2013;33:648–50.

[33] Coimbra HS, Fernandes CG, Soares MP, Meireles MCA, Radamés R, Schuch LFD. Ehrlichiose monocítica equina no Rio Grande do Sul: aspectos clínicos, anátomo-patológicos e epidemiológicos . Pesqui Veterinária Bras 2006;26:97–101.

[34] Cabezas-Cruz A, Zwegarth E, Vancová M, Broniszewska M, Grubhoffer L, Passos LMF, et al. Ehrlichia minasensis sp. nov., isolated from the tick Rhipicephalus microplus. Int J Syst Evol Microbiol 2016;66:1426–30.

[35] Miranda J, Mattar S. Molecular detection of Anaplasma sp. and Ehrlichia sp. in ticks collected in domestical animals, Colombia. Trop Biomed 2015;32:726–35.

[36] Nava S, Beati L, Labruna MB, Cáceres AG, Mangold AJ, Guglielmone AA. Reassessment of the taxonomic status of Amblyomma cajennense (Fabricius, 1787) with

the description of three new species, *Amblyomma tonelliae* n. sp., *Amblyomma interandinum* n. sp. and *Amblyomma patinoi* n. sp., and reinstatement of *Amblyomma mixtum* Koch, 1. *Ticks Tick Borne Dis* 2014;5:252–76. doi:10.1016/j.ttbdis.2013.11.004.

[37] Guglielmo AA, Robbins RG, Apanaskevich DA, Petney TN, Estrada-Peña A, Horak IG. *The Hard Ticks of the World*. 2014. doi:10.1007/978-94-007-7497-1.

[38] Agudelo-Ruiz Y, Acevedo-Gutiérrez L, Montoya-Sánchez A, Paternina L. Molecular identification of tick-borne hemoparasites in equines from Northwestern Colombia. *Rev MVZ Córdoba* 2017;22:6004–13.

[39] Carmichael R, Duell J, Holbrook T, Herrin B, Leutenegger C, O'Connor T, et al. Antibodies Reactive to *Ehrlichia* spp. Are Common in Oklahoma Horses. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2014;14:552–6. doi:10.1089/vbz.2013.1570.

[40] Vieira TSWJ, Qurollo BA, Mongruel ACB, Baggio RA, Vidotto O, Breitschwerdt EB, et al. Potentially same novel *Ehrlichia* species in horses in Nicaragua and Brazil. *Emerg Infect Dis* 2018. doi:10.3201/eid2405.172076.

[41] Soares HS, Marcili A, Barbieri ARM, Minervino AHH, Malheiros AF, Gennari SM, et al. Novel *Anaplasma* and *Ehrlichia* organisms infecting the wildlife of two regions of the Brazilian Amazon. *Acta Trop* 2017;174:82–7. doi:https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.07.006.

[42] Labruna MB, Kerber CE, Ferreira F, Faccini JLH, De Waal DT, Gennari SM. Risk factors to tick infestations and their occurrence on horses in the state of São Paulo, Brazil. *Vet Parasitol* 2001;97:1–14. doi:10.1016/S0304-4017(01)00387-9.

[43] Karagiannis I, Schimmer B, Van Lier A, Timen A, Schneeberger P, Van Rotterdam B, et al. Investigation of a Q fever outbreak in a rural area of The Netherlands. *Epidemiol Infect* 2009;137:1283–94. doi:DOI: 10.1017/S0950268808001908.

[44] Bamberg WM, Pape WJ, Beebe JL, Nevin-Woods C, Ray W, Maguire H, et al. Outbreak of Q fever associated with a horse-boarding ranch, Colorado, 2005. *Vector-Borne Zoonotic Dis* 2007;7:394–402.

[45] Meza J, Rosso F. Neumonía por *Coxiella burnetii*: presentación de un caso y revisión de la literatura. *Rev CES Med Vet y Zootec* 2012;26:201–7.

- [46] Mattar S, Contreras V, Gonzalez M, Camargo F, Alvarez J, Oteo JA. Infection by *Coxiella burnetii* in a patient from a rural area of Monteria, Colombia. *Rev Salud Publica* 2014;16:789–92.
- [47] Máttar S, Parra M. Detection of antibodies to *Anaplasma*, *Bartonella* and *Coxiella* in rural inhabitants of the Caribbean area of Colombia. *Rev MVZ Córdoba* 2006;11:781–9.
- [48] Seo MGX, Lee SH, Ouh IO, Lee GH, Goo YK, Kim S, et al. Molecular detection and genotyping of coxiella-like endosymbionts in ticks that infest horses in south korea. *PLoS One* 2016;11:1–9. doi:10.1371/journal.pone.0165784.
- [49] Guimard T, Amrane S, Prudent E, El Karkouri K, Raoult D, Angelakis E. Case Report: scalp eschar and neck lymphadenopathy associated with bacteremia due to *Coxiella*-like bacteria. *Am J Trop Med Hyg* 2017;97:1319–22.

Limitaciones y Perspectivas

Los resultados previamente expuestos tuvieron algunas limitaciones, que, aunque se trataron de controlar, no fue posible en su totalidad. Estas limitaciones deben ser considerados al extrapolar los resultados a región del estudio.

Nuestros resultados deben analizarse a la luz del sesgo de información proveniente del sitio de origen de los animales, debido a que en el país la trazabilidad del movimiento de los animales no es exacto. Por esta razón y en conversación con los conductores que transportaban los animales, se estableció que podíamos tener una incertidumbre entre 0 y el 15%. Asimismo. La selección de la muestra fue a conveniencia dada las dinámicas de la planta y los procesos de faenado, lo cual imposibilitó la hacer una selección aleatoria de con los datos, de igual manera no se pudo obtener representatividad proporcional de cada municipio y temporal debido a que el proceso de llegada de los animales no era controlable por los investigadores.

La planta de Beneficio presentó en fechas anteriores algunos cierres, por lo cual al principio del muestreo se tomó un mayor número de animales con el fin de prever perdida de muestras; afortunadamente durante el año de muestreo no hubo inconveniente, por lo que se obtuvo un sobre-muestreo.

La propuesta de riesgo que se generó requiere posteriores validaciones en campo y alimentación con datos nuevos en la zona para adquirir solidez y robustez, dado que el modelo se alimentó principalmente con los datos del macroproyecto. A pesar de eso y queriendo optimizar la información obtenida, esta propuesta puede guiar proyectos de investigación posteriores y medidas en salud pública.

Los hallazgos obtenidos complementan la información sobre la rickettsiosis en esta parte del país, se espera a futuro que estos datos de potenciales zonas de circulación sean el soporte de estudios posteriores, especialmente en el estudio de la diversidad de especies de *Rickettsia* en las garrapatas, biología de los potenciales vectores y su impacto en salud pública, haciendo un enfoque más particular del comportamiento de la entidad en población humana de las nuevas zonas identificadas.

Se espera realizar estudios en otros animales categorizados como centinelas, específicamente los caninos, debido a que sus datos pueden complementar el escenario epidemiológico.

Durante la pasantía se adquirieron conocimientos sobre las técnicas de cultivo celular, lo cual permitirá en estudios futuros ampliar los objetivos y obtener nuevas cepas de la región.

Es sabido que la rickettsiosis en el país es un tema aún poco conocido, especialmente en su eco-epidemiología donde se integren las relaciones hospedero-patógeno-ambiente, por lo cual las técnicas implementadas en el actual proyecto mejorarán las maneras de abordaje en nuestro laboratorio.

Y en último lugar se espera que estos datos fortalezcan la evidencia de que la rickettsiosis es un evento de salud que debe ser considerado para vigilar, o al menos hacerlo en zonas prioritizadas y en pacientes con síndromes febriles.

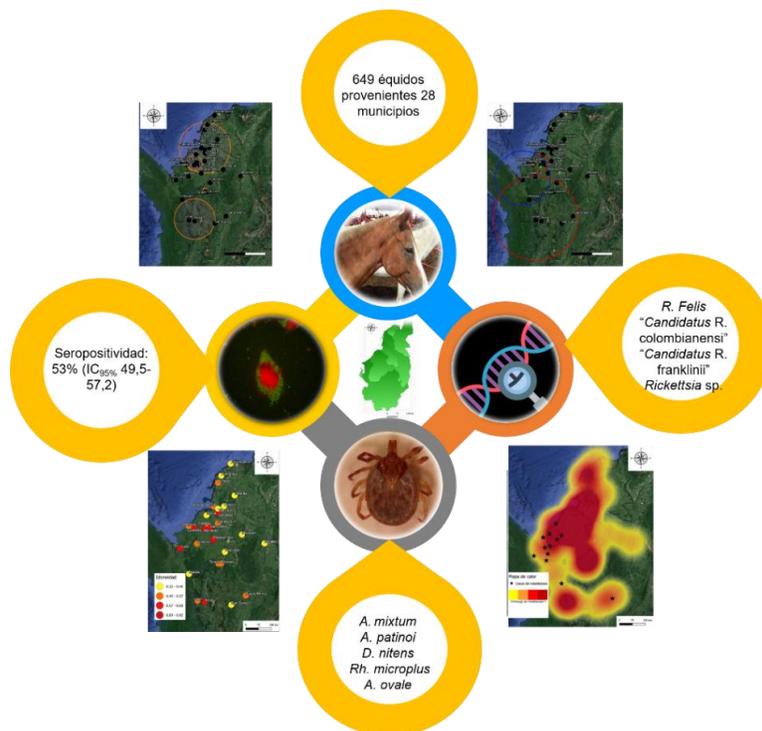
Conclusión general

Los hallazgos de este estudio en el noroeste de Colombia y gracias al uso de los équidos como centinelas, indican zonas probables de circulación de *Rickettsia* spp., de diversas especies de garrapatas, incluyendo dos especies del complejo *A. cajennense*, (*A. mixtum* y *A. patinoi*), *D. nitens* y *Rh. microplus*; además de cuatro especies de *Rickettsia* (*R. felis*, “*Candidatus R. colombianensi*”, “*Candidatus R. franklinii*” y una cercana a “*Candidatus R. mendelii*”). Esta información en conjunto permitió construir una propuesta de riesgo para rickettsiosis, la cual esperamos sea de ayuda para estudios posteriores, especialmente de vigilancia en la región.

Estos hallazgos contribuyen al conocimiento y epidemiología de estos agentes transmitidos por garrapatas en el país. Se espera que en las zonas identificadas se apliquen medidas de prevención, control y los protocolos de tratamiento con doxiciclina ante la sospecha de rickettsiosis humana.

Estos datos se complementaron con una exploración de *Ehrlichia* spp. y *Coxiella burnetii*, lo cual evidencia la exposición de los équidos con bajas seropositividades a estos agentes.

Figura final. Se sintetizan los hallazgos más significativos del macroproyecto.



Material suplementario

Tabla S-1. Números de acceso al Genbank de las secuencias utilizadas para el análisis filogenético.

Especie	<i>gltA</i>	<i>htrA</i>	16RNAm	<i>Sca5(ompB)</i>
<i>R. bellii</i>	CP000087			--
<i>R. canadensis</i>	CP003304			--
<i>R. prowazekii</i>	CP004888			
<i>R. typhi</i>	AE017197			
<i>R. felis</i>	CP000053			
<i>R. australis</i>	CP003338			
<i>R. akari</i>	CP000847			
" <i>Candidatus asembonensis</i> " R.	KY650697	MH325383	KJ569092	KY650699
<i>R. slovacae</i>	CP002428			
<i>R. sibirica</i>	MF002541-KU310587	MF002549	NR_118678	AF123722
<i>R. honei</i>	U59726	AF060704	NR_1144491	AF123724
<i>R. rickettsii</i>	CP000848			
<i>R. rhipicephali</i>	CP013133			
<i>R. parkeri</i>	CO003341			
<i>R. parkeri</i> str. Atlantic rainforest	CP040325			
<i>R. mongolotimonae</i>	DQ097081	KT438781	DQ097085	DQ09783
<i>R. massiliae</i>	CP003319			CP000683
<i>R. conorii</i>	AE006914			
<i>R. amblyommatis</i>	CP14420			
<i>R. africae</i>	CP001612			CP012420
<i>R. montanensis</i>	CP003340			
" <i>Candidatus R. mendelii</i> "	KJ882310	--	KY348769	--
' <i>Candidatus colombianensi</i> ' R.	MF034493	--		

Tabla S-2. Números de acceso al Genbank de las secuencias obtenidas en el estudio

Código garrapata	Cebadores		Código Genbank
T46	CS78	CS323	MN817133
T05	CS78	CS323	MN817134
T229	CS78	CS323	MN817135
T235	CS78	CS323	MN817136
T324	CS78	CS323	MN817137
T341	CS78	CS323	MN817138
T311	CS78	CS323	MN817139
T523	CS78	CS323	MN817140
T014	CS78	CS323	MN817141
T014	CS239	CS1069	MN817142
T311	CS239	CS1069	MN817143
T523	CS239	CS1069	MN817144
T309	CS239	CS1069	MN817145
T955	CS239	CS1069	MN817146
T232	CS239	CS1069	MN817147
T955	rompB SFG IF	rompB SFG IR	MN817148
T472	rompB SFG IF	rompB SFG IR	MN817149
T523	rompB SFG IF	rompB SFG IR	MN817150
T523	120-M59	120-807	MN817151
T311	120-M59	120-807	MN817152
T014	120-M59	120-807	MN817153
T018	120-M59	120-807	MN817154
T021	120-M59	120-807	MN817155
T41	CS78	CS323	MN817156
T41	fD1	Rc16S.452n	MN817157
T46	fD1	Rc16S.452n	MN817158
T46	17KdsF	17KdsR	MN817159